

**Fluorometrische Bestimmung von malaria-
wirksamen 6 - Aminoquinolinen nach dünn-
schichtchromatographischer Trennung**

von

Ulrich Münch

aus

Landeshut

1972 357

**Fluorometrische Bestimmung von malaria-
wirksamen 6-Aminochinolinen nach dünn-
schichtchromatographischer Trennung**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Ulrich Münch

aus

Landeshut

Als Dissertation genehmigt von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung : 10. Mai 1972

Dekan : Universitätsprofessor Dr. K. J a c o b s

Berichterstatter : Universitätsprofessor Dr. O. D a n n

Berichterstatter : Universitätsprofessor Dr. G. H e s s e

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1967 bis August 1971 im Institut für Angewandte Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. O. D a n n, danke ich sehr herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, sein stets förderndes Interesse an ihrem Fortgang und für viele wertvolle Ratschläge bei ihrer Durchführung.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<u>Zusammenfassung</u>	1
1. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Untersuchungen	2
1. 1. Einleitung	2
1. 2. Malariawirksame Chinolin-Derivate	2
1. 3. Einfluß einer Methyl- oder Methoxygruppe in 4-Stellung von 6- und 8-Aminochinolinen auf die biologische Aktivität	5
1. 4. Mögliche Beziehungen zwischen biologischer Aktivität von 6-Aminochinolinen und der Ab- nahme ihrer Konzentration in Versuchstieren	8
2. Wahl der Analysenmethode	10
2. 1. Überblick über bisher angewendete Methoden bei der quantitativen Bestimmung von malariawirksamen 4- und 8-Aminochinolinen in biologischem Material	10
2. 1. 1. Photometrie im sichtbaren Licht	10
2. 1. 2. Photometrie im UV-Licht	11
2. 1. 3. Fluorometrie	11
2. 1. 4. Isotopenmarkierung mit ^{15}N und ^{14}C	13
2. 1. 5. Chromatographische Verfahren	13
2. 2. Gesichtspunkte für die Wahl der eigenen Arbeitsweise für die quantitative Bestimmung von 6-Aminochino- linen in biologischem Material	14
2. 2. 1. Isolierung der 6-Aminochinoline aus tierischem Gewebe und Ausscheidungsprodukten	14
2. 2. 2. Quantitative Bestimmung der isolierten Verbindungen ...	16
2. 2. 3. Kombination von dünn-schichtchromatographischer Trennung und fluorometrischer Bestimmung	16

2.2.4.	Meßanordnung des Zeiss Chromatogramm-Spektralphotometers für Fluoreszenzmessungen	17
3.	Ausarbeitung der Arbeitsvorschriften	20
3.1.	Fluoreszenz von Aminochinolin	20
3.1.1.	Einfluß von Lösungsmitteln auf die Fluoreszenz von 6-Aminochinolin sowie von Primaquine und Resochin	20
3.1.2.	Veränderungen der Fluoreszenz von 6-Aminochinolin durch Luft und Licht	21
3.1.2.1.	Löschung der Fluoreszenz	21
3.1.2.2.	Abnahme der Fluoreszenz durch chemische Vorgänge ...	22
3.1.3.	Fluoreszenzspektren und Fluoreszenzausbeuten von 6-Aminochinolin und Primaquine in Lösung	23
3.2.	Direkte fluorometrische Bestimmung von Aminochinolin	26
3.2.1.	Dünnschichtchromatographische Trennung der Aminochinoline	26
3.2.2.	Konstanthalten der Fluoreszenzintensität der Flecken auf dem Dünnschichtchromatogramm	29
3.2.3.	Messung der Fluoreszenz	31
3.2.4.	Linearer Meßbereich	32
3.2.5.	Nachweisgrenze und Wahl des Meßbereiches für die quantitative Bestimmung	34
3.2.6.	Reproduzierbarkeit der Bestimmung	36
3.3.	Aufarbeitung von biologischem Material	37
3.3.1.	Gewinnung des biologischen Untersuchungsmaterials und Vorbereitung zur Extraktion	37
3.3.2.	Wahl des Extraktionsmittels	39
3.3.3.	Wahl der Extraktionsbedingungen	41
3.3.4.	Anreicherung der Aminochinoline durch Ausschütteln der organischen Phase mit Säure	43
3.4.	Überprüfung der Analysenmethode	47

3.4.1.	Reproduzierbarkeit bei gleichzeitiger Aufarbeitung identischer Blutproben	47
3.4.2.	Ausbeute in Zusatzversuchen	48
4.	Tierversuche	52
4.1.	Durchführung der Versuche	52
4.1.1.	Dosierung der Aminochinoline	52
4.1.2.	Applikation der Aminochinoline	52
4.1.3.	Verdünnung der Analysenproben bei der Aufarbeitung ...	53
4.1.4.	Berechnung der Analysen	53
4.2.	Meßergebnisse	54
4.2.1.	Metaboliten der Aminochinoline	54
4.2.2.	Gehalt des biologischen Materials an unveränderten Aminochinolen	61
4.2.2.1.	Blut	61
4.2.2.2.	Exkremente	67
4.2.2.3.	Lebergewebe	72
4.3.	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	74
4.3.1.	Gehalt des biologischen Materials an unveränderten Aminochinolen	74
4.3.1.1.	Blut	74
4.3.1.2.	Exkremente	78
4.3.1.3.	Lebergewebe	80
4.4.	Folgerungen aus den Ergebnissen der Tierversuche	81
4.4.1.	Verhalten der 6-Aminochinoline in der Maus und im Kanarienvogel	81
4.4.2.	Unterschiede zwischen Maus und Kanarienvogel in der Elimination der 6-Aminochinoline	86
4.4.3.	Toxizität und Elimination von B 505 bei Maus und Kanarienvogel	87
5.	Arbeitsvorschriften	89
5.1.	Allgemeine Angaben	89

5.1.1.	Geräte	89
5.1.2.	Materialien und Reagenzien	90
5.1.3.	Lösungsmittel	91
5.1.4.	Reinigung der Glasgeräte	91
5.1.5.	Beschichtung und Trocknung der Dünnschichtplatten	92
5.2.	Vorbereitung der Tierversuche	92
5.2.1.	Verwendete Aminochinoline	92
5.2.2.	Herstellung der Injektionslösung	93
5.2.3.	Applikation der Injektionslösung	93
5.2.4.	Versuchstiere	94
5.2.5.	Beschreibung der Stoffwechselkäfige	94
5.3.	Gewinnung von Proben aus biologischem Material	96
5.3.1.	Blut	96
5.3.2.	Exkrementen	97
5.3.3.	Leber	98
5.3.4.	Vergleichsproben	98
5.4.	Extraktion der Proben	98
5.4.1.	Hämolyse und Extraktion von Oxalatblut	98
5.4.2.	Zerkleinerung und Extraktion von Exkrementen	100
5.4.3.	Zerkleinerung und Extraktion von Lebergewebe	101
5.5.	Ausschütteln der organischen Phase mit Säure	102
5.5.1.	Ausschütteln im Zentrifugenglas	102
5.5.2.	Ausschütteln in einer Ampulle	103
5.6.	Herstellung der Vergleichslösungen für die DC	106
5.7.	Vorbereitung der Dünnschichtplatten für die Chromatographie	106
5.8.	Chromatographie unter N_2	109
5.9.	Vorbereitung des Chromatogramms zur Messung	112
5.9.1.	6-Aminochinoline	112
5.9.2.	Resochin	113
5.9.3.	Primaquine	113

5.10.	Direkte fluorometrische Bestimmung	114
5.10.1.	Einstellungen am Meßgerät	114
5.10.2.	Ausführung der Fluoreszenzmessung	115
5.10.3.	Auswertung der Fluoreszenzintensitätsortskurven	116
5.10.4.	Berechnung der Analysen	116

Literaturverzeichnis	118
----------------------------	-----

Lebenslauf

ooOoo

ZUSAMMENFASSUNG

Die malariawirksamen Verbindungen 6-(4-Diäthylamino-1-methyl-butyl-amino)-5,8-dimethoxy-2-methyl-chinolin (I), das 4-Methoxy-Derivat von I, das 4-Methyl-Derivat von I und 6-(4-Amino-1-methyl-butyl-amino)-5,8-dimethoxy-2-methyl-chinolin sowie Resochin und Primaquine wurden nach parenteraler Applikation aus Blut, Exkrementen und Leber von Mäusen und Kanarienvögeln extrahiert, dünnschichtchromatographisch getrennt und direkt fluorometrisch bestimmt. Die Bestimmung der 6-Aminochinoline mußte unter Luftausschluß erfolgen. Die Nachweisgrenze der untersuchten Aminochinoline lag bei 4 ng pro Fleck oder etwa 10 ng pro ml Blut.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit im Blut, der Konzentration in der Leber und der Ausscheidung mit den Exkrementen von Verbindung I und ihrer unterschiedlichen akuten Toxizität bei einmaliger Applikation für Maus und Kanarienvogel konnte nicht festgestellt werden.

1. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Untersuchungen

1.1. Einleitung

Die Erreger der Malaria, Plasmodien ^{36, 82)}, vermehren sich in zwei Phasen, in einer ungeschlechtlichen in Wirbeltieren und in einer geschlechtlichen in Mücken. Zur vollen Entwicklung ist ein Wirtswechsel nötig ⁷⁷⁾.

Da sich die Plasmodien bisher nicht wie Bakterien in vitro züchten lassen ²⁸⁾ und außerhalb des Wirtes nur sehr begrenzt lebensfähig bleiben ⁸¹⁾, wird die Prüfung einer neuen Verbindung auf Malariawirksamkeit am infizierten Tier durchgeführt. Zu diesen Versuchen können wegen der strengen Wirtsspezifität ^{36, 82)} der menschenpathogenen Plasmodien ⁷²⁾ nur ähnliche, ebenfalls für bestimmte Tiere spezifische Malariaerreger herangezogen werden ^{93, 81)}. Deshalb ist die Auswahl geeigneter Versuchstiere sehr eingeschränkt.

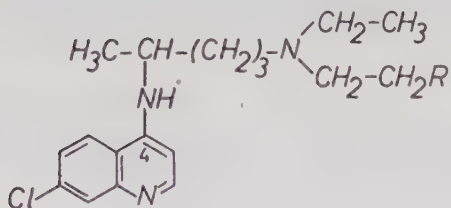
Heute prüft man die Malariawirksamkeit neuer Verbindungen orientierend in der Regel an drei verschiedenen Arten von Kleintiermalaria ⁸⁰⁾, an Plasmodien cathemerium im Kanarienvogel, an *P. gallinaceum* im Hühnchen und an *P. berghei* in der Maus.

1.2. Malariawirksame Chinolin-Derivate

Nach einer von S c h ö n h ö f e r ⁹⁵⁾ 1942 veröffentlichten Chinon-Hypothese, die sich bei der Auffindung von Arzneimitteln gegen Malaria bewährte ²²⁾, sind nur solche Aminochinolin-Derivate malariawirksam, deren sekundäre Aminogruppe in 4-, 6- oder 8- Stellung des Chinolins steht, siehe Formelübersicht.

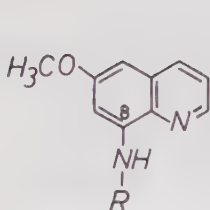
FORMELÜBERSICHT

Einige malariewirksame 4-, 6- und 8- Aminochinolone



$R = H$ Resochin (Chloroquine)

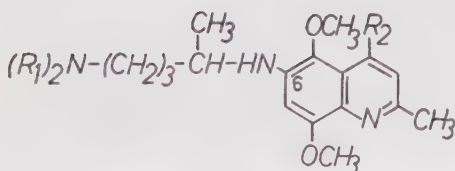
$R = OH$ Hydroxychloroquine



$R = \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ -CH-(CH_2)_3-N(C_2H_5)_2 \end{array}$ Plasmochin

$R = \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ -CH-(CH_2)_3-NH_2 \end{array}$ Primaquine

$R = -(CH_2)_5-NH-\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ CH \\ | \\ CH_3 \end{array}$ Pentaquine



R_1	R_2	Verbindung
C_2H_5	H	I = B 505
C_2H_5	OCH_3	II
C_2H_5	CH_3	III
H	H	IV

In die Therapie sind bisher nur Derivate vom 4- und 8-Aminochinolin-
typ eingeführt worden ⁴³⁾. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihres Wir-
kungsspektrums und deshalb auch in Bezug auf ihren vermutlichen Wir-
kungsmechanismus ^{90, 81)}.

Nicht im Einklang mit der Schönhöfer'schen Chinon-Hypothese stand
die Tatsache, daß 6-Aminochinoline als kaum wirksam galten, bis
Schönhöfer und Schulemann zeigen konnten, daß 5,8-
Dimethoxy-Verbindungen der 6-Aminochinolin-Reihe bei der Kanarien-
vogelmalaria mit Plasmodium cathemerium wirksamer sind als die bekann-
ten 4- und 8-Aminochinoline ⁹⁴⁾. Die von ihnen synthetisierte, wirk-
samste Verbindung I ⁹⁴⁾, mit der auch die Infektion von Hühnchen mit
P. gallinaceum ausgeheilt werden konnte ²⁵⁾, erwies sich als sehr toxisch
für Säugetiere ^{11, 29)}. Diese Verbindung bildete unter dem Prüfnamen
B 505 den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen in den Arbeitskrei-
sen von E.F. Elslager bei der Fa. Parke, Davis & Co., USA,
und insbesondere im hiesigen Institut ^{96, 2, 74, 84, 45, 112, 29, 76)},
besser verträgliche, wirksamere, basisch alkylierte 6-Aminochinoline
herzustellen. Da in Ostasien menschliche Malariaerreger nicht bloß ge-
gen Paludrin und Pyrimethamin sowie Sulfonamide, sondern auch in zu-
nehmendem Maße gegen Resochin resistent werden ⁸¹⁾, wird die Suche
nach Mitteln gegen resochinresistente Malaria sehr vordringlich ²⁶⁾.
Deshalb war es bedeutungsvoll, daß bei der Prüfung von Verbindung III ⁷⁴⁾
und des erstmalig von Schrimpl ⁹⁶⁾ hergestellten 6-(3'-Diäthyl-
amino-propylamino)-5,8-dimethoxy-chinaldin an Resochin-resistenten
Stämmen von P. berghei in Mäusen keine Kreuzresistenz festgestellt wurde
(29, 25).

1.3. Einfluß einer Methyl- oder Methoxygruppe in 4-Stellung
von 6- und 8-Aminochinolinen auf die biologische Aktivität

6-Aminochinolinreihe: Einen bemerkenswerten Fortschritt gegenüber B 505 hinsichtlich der akuten Toxizität nach einmaliger Verabreichung brachte die Einführung einer Methyl- oder Methoxy-Gruppe in 4-Stellung des B 505 - Verbindung III ⁷⁴⁾ und II ²⁾ - wie von F i n k, N i c k e l und D a n n berichtet wird ²⁹⁾. Ein Teil ihrer Ergebnisse ist in Tab. 1 zusammengefaßt. Daraus läßt sich folgendes erkennen:

Tabelle 1

Akute Toxizität (LD_{50}) nach einmaliger Applikation und
suppressiv Wirkung (ED_{50}) von neuen 6-Aminochinoli-
nen im Vergleich mit Resochin und Primaquine.
Nähere Einzelheiten bei F i n k ²⁹⁾.

Verbindung	LD_{50} in mg / kg		ED_{50} in mg / kg	
	NMRI Maus	Kanarienvogel	P. vincke NMRI Maus	P. cathem. Kanarienvog.
Applikation :	1 x i. p.	1 x i. v.	1 x i. p.	1 x i. v.
B 505	3,2	66	0,4	0,9
III	45	47	0,5	0,8
II	60	51	0,4	0,8
Resochin	66	40	1,5	1,8
Primaquine	60	41	0,4	1,3

Die Einführung eines Substituenten, wie Methyl- oder Methoxy- in die 4- Stellung von B 505 bleibt ohne Einfluß auf die Wirksamkeit. Die Verträglichkeit für den Kanarienvogel nach einmaliger Applikation bleibt eben-

falls fast unverändert, dagegen steigt die Verträglichkeit für die Maus nach einmaliger Applikation um das fünfzehn- bis zwanzigfache gegenüber B 505 an.

In der 6-Aminochinolin-Reihe zeigen die Verbindungen II und III für Maus und Kanarien gleiche Verträglichkeit, was bei parenteraler Applikation gegenüber oraler Verabreichung bei Säuger und Vogel auch erwartet werden kann ¹⁷⁾ und auch für Resochin zutrifft. Dagegen fällt auf, daß nach jeweils einmaliger Applikation einerseits Primaquine für den Kanarienvogel etwas toxischer ist als für die Maus, während andererseits B 505 vom Kanarienvogel wesentlich besser als von der Maus vertragen wird.

Diese Beobachtung in der 6-Aminochinolin-Reihe bildete den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit.

Auch E l s l a g e r ²⁵⁾ stellte bei der Prüfung von 6-Aminochinolin, die sich nur in der basischen Seitenkette von B 505 unterscheiden, mit Überraschung fest, daß sie für Hühnchen wesentlich verträglicher waren als für Mäuse, ähnlich wie B 505 für Kanarienvögel verträglicher ist als für Mäuse oder Affen ¹¹⁾. Deshalb wurde vermutet, daß hier ein grundsätzlicher Unterschied zwischen Säugern und Vögeln vorliegt. Dieser Unterschied sollte in der vorliegenden Untersuchung erklärt werden.

Tabelle 2

Einfluß einer Methyl- oder Methoxygruppe in 4-Stellung auf die Toxizität (Hühnchen) und die Malariawirksamkeit (P. gall.) in der 8-Aminochinolin-Reihe nach Coatsney [4].

MTD = maximale tolerierte Dosis, MED = minimale effektive Dosis

SN	Chinolin, 8	Substituenten in Stellung			MTD mg/kg	MED mg/kg
		6	4			
3114	-NH-(CH ₂) ₂ -N (C ₂ H ₅) ₂	OCH ₃	H		7,2	4
15312	-NH-(CH ₂) ₂ -N (C ₂ H ₅) ₂	OCH ₃	CH ₃		80	4
13457	-NH-(CH ₂) ₃ -N (C ₂ H ₅) ₂	H	H		10	3,9
12009	-NH-(CH ₂) ₃ -N (C ₂ H ₅) ₂	H	OCH ₃		50	7,8
3559	-NH-(CH ₂) ₃ -NH-CH(CH ₃) ₂	OCH ₃	H		1,5	0,4
15311	-NH-(CH ₂) ₃ -NH-CH(CH ₃) ₂	OCH ₃	CH ₃		19	1
13276	-NH-(CH ₂) ₅ -NH-CH(CH ₃) ₂	OCH ₃	H		5,7	0,1
15302	-NH-(CH ₂) ₅ -NH-CH(CH ₃) ₂	OCH ₃	CH ₃		14	0,25
11191	-NH-(CH ₂) ₆ -N (C ₂ H ₅) ₂	OCH ₃	H		9,4	0,31
14011	-NH-(CH ₂) ₆ -N (C ₂ H ₅) ₂	OCH ₃	CH ₃		49	83

In der 8-Aminochinolinreihe zeigte sich, wie aus Tab. 2 zu ersehen ist, eine Zunahme der Verträglichkeit bei nur geringer Abnahme der Wirksamkeit, wenn in 4-Stellung eine Methyl- oder Methoxy-Gruppe eingeführt wurde. Allerdings wurden die angegebenen Werte in Versuchen mit Hühnchen erhalten.

Zum Vergleich der Ergebnisse in beiden Verbindungsreihen lassen sich nur die Versuche mit Hühnchen und Kanarienvögeln heranziehen, da auf Grund ihrer Verwandtschaft angenommen werden kann, daß sie sich gegenüber biologisch aktiven Substanzen gleichartig verhalten. Demnach wird durch Einführung eines Substituenten in 4-Stellung von 8-Aminochinolinen die Verträglichkeit für Vögel verbessert (Tab. 2), bei 6-Aminochinolinen jedoch noch nicht verändert (Tab. 1).

1.4. Mögliche Beziehungen zwischen biologischer Aktivität von 6-Aminochinolinen und der Abnahme ihrer Konzentration in Versuchstieren

Das Verhalten von B 505 kann theoretisch durch Art-Unterschiede in der Empfindlichkeit der Rezeptoren, in der Elimination ¹⁰⁾ allein oder im Zusammenhang mit dem Metabolismus ¹¹⁰⁾ hervorgerufen werden, wobei diese Unterschiede sowohl quantitativer als auch qualitativer Art sein können ¹⁾.

Bei der Elimination sind Unterschiede praktisch am einfachsten festzustellen, da die toxische oder therapeutische Wirkung einer Substanz an eine bestimmte Konzentration im Körper gebunden ist ⁶⁷⁾.

Diese für die Wirkung verantwortliche Konzentration wird nach Brodie¹⁰⁾ in den meisten Fällen am besten durch den Plasmaspiegel des Blutes repräsentiert, der wiederum von der Resorption, der Verteilung bzw. Speicherung, dem Metabolismus und der Ausscheidung der Substanz abhängt. Den Einfluß der Resorption auf den Plasma- bzw. Blutspiegel kann man durch geeignete parenterale Applikation ausschließen.

Auf Grund dieser Überlegungen wurde angestrebt, Unterschiede im Schicksal der 6-Aminochinoline B 505 bzw. II und III in den Versuchstieren durch quantitative Bestimmung der unveränderten Substanzen in Blut, Leber und Exkrementen von Mäusen und Kanarienvögeln festzustellen. Außerdem wurde untersucht, wie sich die freie Aminogruppe in der Seitenkette von Verbindung IV gegenüber der Diäthylaminogruppe in der 6-Aminochinolinreihe auf die Elimination auswirkt.

Um die 6-Aminochinoline in ihrem pharmakokinetischen Verhalten im Versuchstier mit den gebräuchlichen 4- und 8-Aminochinolinen vergleichen zu können, mußten die Standardmalaria Mittel Resochin und Primaquine ebenfalls untersucht werden.

2. Wahl der Analysenmethode

2.1. Überblick über bisher angewendete Methoden bei der quantitativen Bestimmung von malariewirksamen 4- und 8-Aminochinolinen in biologischem Material

In diesem Überblick sind die 4-Aminochinoline Resochin und Hydroxychloroquine sowie die 8-Aminochinoline Plasmochin, Primaquine und Pentaquine berücksichtigt (Formelübersicht in Kap. 1.2.).

2.1.1. Photometrie im sichtbaren Licht

Da die angeführten Substanzen farblos sind, müssen sie erst in Verbindungen umgewandelt werden, die im sichtbaren Bereich Licht absorbieren oder streuen.

Ebenso wie die meisten Stickstoffbasen bilden auch die 4- und 8-Aminochinoline mit Alkaloid-Fällungsreagenzien schwerlösliche, meist gefärbte Salze. Mit der entstehenden Trübung wurde Plasmochin in Urin bestimmt²⁰⁾ und Resochin^{34, 33)} in Urin bis 0,1 mg %, sowie in Blut⁹²⁾ bis 0,2 mg/l.

Bei einer weiteren, unspezifischen Methode macht man sich die Eigenschaft zunutze, daß Stickstoffbasen mit sauren Farbstoffen Komplexe bilden, die mit einem organischen Lösungsmittel aus wässriger Lösung extrahierbar sind. Die ausgeschüttelte Farbstoffmenge ist der vorhandenen Menge an Stickstoffbase proportional. Diese allgemeine Methode wurde von Brodie⁷⁾ beschrieben, wobei er als Beispiel Chinidin wählte, und von Mc Chesney⁶¹⁾ für Resochin benutzt.

Etwas spezifischer wird der Nachweis durch die Bildung eines gefärbten Reaktionsproduktes. Läßt man auf Resochin Aconitinsäure mit Acetanhydrid in Äthylendichlorid einwirken, so entsteht ein roter Farbstoff ¹⁰³⁾, der eine Bestimmung von Resochin in Urin bis 1 µg/ml ermöglicht. Die aufgeführten 8-Aminochinoline kuppeln mit Diazoniumsalzen zu gefärbten kolorimetrierbaren Azoverbindungen ²⁰⁾. Nach einer Anleitung von Brodie ⁶⁾, mit der 0,25 µg Plasmochin nachweisbar sind, wurden Plasmochin in menschlichem Blutplasma und Gewebe ¹¹³⁾ und im menschlichen Urin ⁸⁾, stickstoffmarkiertes Pentaquine in den Exkrementen von Affen ²⁴⁾ und ¹⁴C-markiertes Pentaquine in Affenurin ⁹⁸⁾ sowie verschiedene 8-Aminochinoline in Blutplasma von Affen ⁴⁷⁾ bestimmt.

2.1.2. Photometrie im UV-Licht

Das Absorptionsspektrum von Resochin zeigt in salzsaurer oder schwefelsaurer Lösung mehrere Maxima ^{19, 101)}, wobei für die quantitative Bestimmung bei 342 nm gemessen wird ^{86, 70, 108, 102, 88)}. Als Nachweisgrenze wurden 1 µg pro g Gewebe ⁸⁶⁾ und 10 µg pro g Probe ⁷⁰⁾ angegeben.

2.1.3. Fluorometrie

Die gute Fluoreszenz der Aminochinoline mit einer 6-Methoxygruppe in konz. Schwefelsäure wurde 1948 von Irvin ⁴⁸⁾ untersucht und zur quantitativen Bestimmung benutzt. Der geringste Gehalt pro Probe bzw. Meßlösung lag bei 0,1 µg.

Resochin ließ sich damals nicht direkt bestimmen, da die Fluorometer noch nicht leistungsfähig genug waren. Das Absorptionsmaximum von Resochin

in wässriger Lösung bei pH 11 liegt mit 335 nm ¹⁰⁶⁾ zwischen den starken Linien der Hg-Lampe, so daß die ohnehin schwache Fluoreszenz nicht stark genug angeregt werden konnte. Außerdem liegt das Fluoreszenzmaximum bei 400 nm ¹⁰⁶⁾ noch im UV-Bereich. Brodie ⁵⁾ half sich 1947 mit der Beobachtung, daß Resochin unter intensiver Bestrahlung mit UV-Licht photochemisch in besser fluoreszierende, unbeständige, nur teilweise aufgeklärte ⁸⁵⁾ Abbauprodukte überführt wird, die einen ersten empfindlichen Nachweis ab 0,1 µg erlaubten. Diese Methode der induzierten Fluoreszenz wurde hinsichtlich des Aufarbeitungsverfahrens 1956 ⁶²⁾ vereinfacht.

Etwa seit 1957 stehen Spektralfluorometer zur Verfügung, mit denen man die Fluoreszenz kontinuierlich zwischen etwa 220 und 800 nm anregen und messen kann ³⁾. Erst mit derartigen Spektralfluorometern wurde es möglich, auch Resochin direkt fluorometrisch zu bestimmen. Für eine große Zahl von Arzneimitteln, einschließlich Resochin und Plasmochin, ermittelte Udenfriend ¹⁰⁶⁾ die Meßbedingungen und "praktischen Nachweisgrenzen" in reinen Lösungen. Als "praktische Nachweisgrenze" wird diejenige Substanzkonzentration definiert, deren Fluoreszenzintensität 20 mal größer als die eines Leerwertes ist. Sie wurde für Resochin und Plasmochin mit etwa 0,05 µg/ml Meßlösung ermittelt. Nun wurde die direkte Fluoreszenz von Resochin in ammoniakalischer Lösung von Gaudette ³⁷⁾, McChesney ⁶³⁾ sowie von Ensor ²⁷⁾ zur Bestimmung herangezogen. Fournel ³²⁾ fand, daß Resochin in Butanol etwa doppelt so gut fluoreszierte wie in Ammoniakflüssigkeit.

2.1.4. Isotopenmarkierung mit ^{15}N und ^{14}C

Das spezielle Verfahren, die Markierung von Verbindungen mit Isotopen, wird im allgemeinen nur dann angewendet, wenn die Verteilung im Organismus und der Metabolismus von Substanzen untersucht werden sollen, die schon in die Therapie eingeführt worden sind oder kurz davor stehen,

So untersuchte Elderfield²⁴⁾ Pentaquine, dessen Seitenkette jeweils das Isotop ^{15}N angereichert enthielt. Die im Urin von Rhesusaffen ausgeschiedene Menge des Stickstoffisotopes wurde massenspektrometrisch bestimmt.

Das Isotop ^{14}C läßt sich leicht durch Messung seiner Radioaktivität nachweisen und bestimmen. An Rhesusaffen wurden in der 6-Methoxy- bzw. 2'-Isopropyl-gruppe ^{14}C -markiertes Pentaquine von Smith⁹⁸⁾ und in 3-Stellung ^{14}C -markiertes Resochin von McChesney⁶⁵⁾ untersucht. Weiterhin wurde der Gehalt von ringmarkiertem Resochin in Mäuseerythrozyten⁶⁰⁾ und die Verteilung in der gesamten Maus bestimmt.

2.1.5. Chromatographische Verfahren

Die quantitative gaschromatographische Bestimmung malariawirksamer Aminochinoline ist bisher nur für Resochin von Holtzman⁴⁶⁾ angegeben worden. Er verwendete keine Extrakte aus biologischem Material, sondern reine Lösungen. Als Nachweisgrenze gibt Holtzman 5 ng Resochin in 1 bis 5 μl pro Einspritzung an. Der dabei erhaltene Peak geht allerdings im sehr unruhigen Untergrundrauschen fast unter, so daß die praktische Nachweisgrenze insbesondere nach Extraktion aus organischen Proben wesentlich höher liegen dürfte. Verglichen mit der praktischen Nachweisgrenze von 50 ng Resochin pro ml Lösung bei spektral-

fluorometrischer Bestimmung (siehe Kap. 2.1.3.) schien die gaschromatographische Bestimmung nicht empfindlicher zu sein.

Papier- und Dünnschichtchromatographie wurden gelegentlich bei der Untersuchung des Metabolismus von Resochin zur Auftrennung der Metaboliten herangezogen. Die Abbauprodukte wurden von K u r o d a ⁵⁸⁾ papierchromatographisch und von M c C h e s n e y ^{64, 65)} dünnschichtchromatographisch getrennt und nach Elution weiter charakterisiert sowie nach verschiedenen Methoden quantitativ bestimmt. Qualitative Untersuchungen unter Verwendung der Dünnschichtchromatographie wurden von C a s t a g n o u ¹³⁾ und R o b i n s o n ⁸⁸⁾ bei Vergiftungsfällen mit Resochin durchgeführt. M ü t i n g ⁷¹⁾ verfolgte die Serumkonzentration von Hydroxychloroquine und seinen Metaboliten mit Hilfe der Papierchromatographie halbquantitativ.

2.2. Gesichtspunkte für die Wahl der eigenen Arbeitsweise für die quantitative Bestimmung von 6-Aminochinolin in biologischem Material

2.2.1. Isolierung der 6-Aminochinoline aus tierischem Gewebe und Ausscheidungsprodukten

Bei der Analyse von 4- und 8- Aminochinolin in organischem Material nach einem der angegebenen Verfahren mußten die Chinoline aus dem biologischen Material nach Zusatz von Base mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden. Über die dabei zu beachtenden Grundsätze hat B r o d i e ⁴⁾ ausführlich an Hand von Beispielen berichtet. Den Mittelpunkt seiner Ausführungen bildet die Abtrennung der zu messenden Sub-

stanzen von störenden Begleitstoffen oder Metaboliten durch selektive Extraktion. Bei dieser Methode versucht man, zur Reinigung des organischen Extraktes die oft sehr geringen Verteilungsunterschiede der voneinander zu trennenden Stoffe zwischen einer wässrigen und einer organischen Phase auszunutzen. Die am besten geeigneten Bedingungen werden durch Verschiebung des pH-Wertes der wässrigen Phase bzw. durch Änderung der Polarität des organischen Extraktionsmittels ausprobiert.

Wie schwierig es sein kann, eine Substanz durch selektive Extraktion von ihren Metaboliten zu trennen, geht aus den umfangreichen Untersuchungen von Mc Chesney ⁶²⁾ zur Bestimmung von unverändertem Resochin und Hydroxychloroquine in biologischem Material hervor. In diesem Beispiel waren die wichtigsten Metaboliten bekannt, so daß eine gezielte Untersuchung möglich war, was in anderen Fällen, z. B. bei der Bestimmung von neuen Substanzen, nicht der Fall ist.

Die auf diese Weise erhaltenen, spezifischen Aufarbeitungsbedingungen für eine Verbindung sind meistens nicht direkt auf andere ähnliche Substanzen übertragbar ⁶⁴⁾.

Die 6-Aminochinoline I bis IV und evtl. auch weitere Verbindungen dieser Reihe sollten aber nach einem einheitlichen Verfahren aufgearbeitet und bestimmt werden können. Deshalb lag es nahe, die Verbindungen zunächst aus biologischem Material nach einem für viele basische Substanzen anwendbaren unspezifischen Verfahren zu extrahieren und anschließend nach einer weiteren allgemein durchführbaren Methode von mitextrahierten, die Bestimmung störenden Begleitsubstanzen zu trennen. Als Trennmethode bot sich die Dünnschichtchromatographie ⁹⁹⁾, DC, an. Die dünn-schichtchromatographische Trennung hat den Vorzug, gleichzeitig mehrere Substanzen, z. B. Metabolite, in einer Analyse nebeneinander erfassen zu können. Durch die R_f -Werte wird eine Identifizierung der Verbindungen erleichtert.

2. 2. 2. Quantitative Bestimmung der isolierten Verbindungen

Für die nach dünnschichtchromatographischer Reinigung erhaltenen Substanzmengen boten sich als die zur Zeit empfindlichsten und allgemein anwendbaren Bestimmungsmethoden für routinemäßige Untersuchungen die Gaschromatographie und die Fluorometrie an. Die 5,8-Dimethoxy-6-aminochinoline fluoreszieren in Lösung besser als Resochin, siehe Kap. 3. 1. 1. . Vorteile der spektralfluorometrischen Bestimmung sind ihre hohe Selektivität, die durch die Wahl der Wellenlänge des Lichtes bei der Anregung und bei der Fluoreszenz gegeben ist. Ein Nachteil, der sich bei quantitativen Fluoreszenzmessungen erst in der Praxis zeigt, ist die starke Abhängigkeit des Fluoreszenzverhaltens von äußeren Faktoren, wie z. B. fluoreszenzlöschenden Beimengungen oder Luftsauerstoff^{23, 31, 107)}, die nicht immer kontrollierbar sind.

2. 2. 3. Kombination von dünnschichtchromatographischer Trennung und fluorometrischer Bestimmung

In Verbindung mit der dünnschichtchromatographischen Trennung läßt sich die Fluoreszenz von Verbindungen auf 2 Arten bestimmen. Nach dem herkömmlichen Verfahren wird die Substanz vom Trägermaterial eluiert und in Lösung gemessen. Diese Bestimmung ist also indirekt. Seit wenigen Jahren ist es möglich, die Fluoreszenz direkt auf der Schicht auszuwerten.

Die direkte fluorometrische Bestimmung ist der indirekten Methode zum Nachweis von Substanzen im Nanogramm-Bereich von vornherein aus folgenden Gründen überlegen⁵⁶⁾: Es sind keine zusätzlichen Arbeitsgänge erforderlich, wie Abkratzen der Schicht, Elution vom Trägermaterial und Abtrennung des Trägermaterials; die damit verbundene Gefahr, Substanz zu verlieren oder Störsubstanzen einzuschleppen, entfällt. Der entschei-

dende methodische Vorteil der direkten fluorometrischen Bestimmung liegt in der verhältnismäßig hohen Substanzkonzentration in der dünnen Schicht. Deshalb erfaßt die direkte fluorometrische Bestimmung etwa 10 mal geringere Substanzmengen als die Messung in Lösung.

In einer Literaturzusammenstellung über die bisherigen Anwendungsmöglichkeiten der Kombination von DC mit direkter fluorometrischer Bestimmung weist Messerschmidt ⁶⁹⁾ darauf hin, daß diese Methode insbesondere für klinisch- und pharmazeutisch-chemische Fragestellungen vorteilhaft ist.

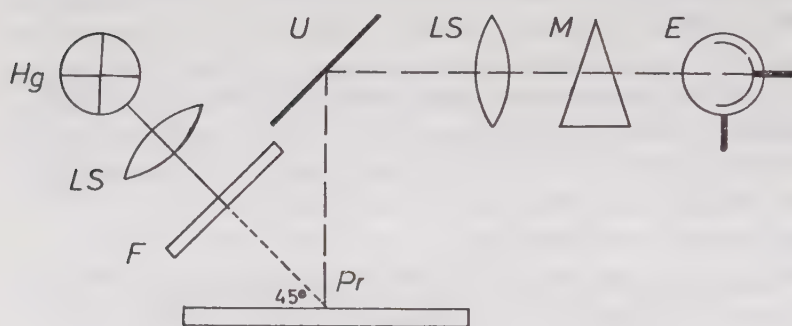
Als die Arbeit begonnen wurde, stand zunächst nur das ZEISS - PMQII-Spektralfluorometer zur Verfügung, so daß zunächst die eluierte Substanz in Lösung bestimmt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse waren wegen der Störanfälligkeit dieser Methode ³⁸⁾ unbefriedigend. Etwa ein Jahr später wurde ein Chromatogrammansatz als Zusatzgerät erworben, das damit zum vielseitig verwendbaren ¹⁰⁰⁾ ZEISS-Chromatogramm-Spektralphotometer erweitert war. Dadurch wurde nun auch die vorteilhafte, direkte fluorometrische Bestimmung vom Dünnschichtchromatogramm möglich.

2. 2. 4. Meßanordnung des ZEISS - Chromatogramm-Spektral- photometers für Fluoreszenzmessungen

Die Meßanordnung des Chromatogramm-Spektralphotometers für Fluoreszenzmessungen wird in Abb. 1 schematisch wiedergegeben. Das Licht einer Hg-Lampe wird unter Verwendung eines geeigneten, austauschbaren Filters auf die waagrecht auf dem Kreutztisch liegende Dünnschichtplatte gelenkt. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht gelangt über ein optisches System zum Monochromator. Das spektral zerlegte Licht wird

mit dem Empfänger gemessen. Die registrierte Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Substanzkonzentration auf der Platte.

Abbildung 1 Chromatogramm-Spektralphotometer der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, in Meßanordnung (Pr-M) für Fluoreszenzmessung.



Hg	=	Quecksilberlampe
LS	=	Linsensystem
F	=	Monochromat-Filter
Pr	=	Kreuztisch mit Dünnschichtplatte
U	=	Umlenkspiegel
M	=	Monochromator
E	=	Empfänger

Es wird jeweils nur die Fluoreszenz einer Teilfläche des Chromatogramms gemessen. Dieser Flächenausschnitt wird entweder von einer kreisförmigen Meßblende begrenzt, deren wirksamer Durchmesser von wenigen mm bis etwa 2 cm erweitert werden, oder von einer rechteckigen Spaltblende, die konstant etwa 4 mm breit und variabel bis 1,4 cm lang sein kann. Mit Hilfe eines Motors führt man das Chromatogramm von der Startlinie

bis zur Fließmittelgrenze an der Meßfläche vorbei. Der dabei gemessene Ausschlag am Meßgerät wird gleichzeitig mit einem Schreiber registriert. Man erhält so die Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven.

Bei der Messung mit der Kreisblende, die den gesamten Fleck einschließt, ist die Substanzmenge pro Fleck der Höhe der Kurvenmaxima direkt proportional; bei Verwendung des Spaltes, der länger sein muß als der Fleck breit ist, besteht eine lineare Beziehung zwischen der Stoffmenge und der Fläche unter der entsprechenden Kurve ⁵⁵⁾.

3. Ausarbeitung der Arbeitsvorschriften

3.1. Fluoreszenz von Aminochinolinen

3.1.1. Einfluß von Lösungsmitteln auf die Fluoreszenz von 6-Amino- chinolinen sowie von Primaquine und Resochin

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Lösungsmittel ist in Tab. 3 wiedergegeben. B 505 und auch die anderen 6-Aminochinolone II, III und

Tabelle 3 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Aminochinolone vom Lösungsmittel. 4 ml der organischen Lösungsmittel enthielten je 1 Tropfen Diäthylamin.

a) = B 505

b) = Primaquine

c) = Resochin

Lösungs- mittel	Fluoreszenz von			Lösungs- mittel	Fluoreszenz von		
	a)	b)	c)		a)	b)	c)
0,1n H_2SO_4	-			Äther	+++	+	
0,1n NH_4OH	-			Benzol	+++	+	
Phosphatpuffer pH 7,1	(-)			Cl-Benzol	+++		
2n Essigsäure	-			Essigester	+++		
Methanol	(+)	(+)		Pyridin	+++		
Methyläthylketon	(+)			THF	+++	+	
Acetonitril	++			Petroläther	+++		
Isopropanol	++			Cyclohexan	++++		(+)
n-Butanol	++	(+)	+++	DMF	++++	++++	
Äthylacetat	++			Dioxan	++++	+	
Isoamylacetat	++			Diglyme	++++		
Chloroform	++		++	Morpholin	++++		
Triäthylamin	++			konz. H_2SO_4	(+)	++++	
Aceton	++	++++					

IV fluoreszierten in konzentrierter Schwefelsäure nur schwach, in wässriger Lösung praktisch nicht, dagegen zeigten sie als freie Basen in einigen organischen Lösungsmitteln eine intensive blaue bis blaugrüne Fluoreszenz, die durch Zusatz von Wasser oder niederen Alkoholen stark vermindert wurde. Eine Zugabe von wenig Diäthylamin zu den organischen Lösungsmitteln, etwa 1 Tropfen zu 4 ml, erhöhte häufig die Fluoreszenzintensität oder hielt sie länger konstant. Je polarer die Lösungsmittel waren, desto langwelliger fluoreszierten die 6-Aminochinoline.

Primaquine fluoreszierte in konz. Schwefelsäure ⁴⁸⁾ besser als in einem anderen Lösungsmittel.

Die Fluoreszenz von Resochin war in Lösung nur schwach ausgeprägt. Während es in n-Butanol ³²⁾ relativ gut fluoreszierte, war die Fluoreszenz in Cyclohexan sehr schwach.

3.1.2. Veränderungen der Fluoreszenz von 6-Aminochinolin durch Luft und Licht

3.1.2.1. Löschung der Fluoreszenz

Die fluoreszenzlöschende Eigenschaft von Sauerstoff war bekannt ²³⁾, sie macht sich aber bei fluoreszierenden Substanzen in sehr unterschiedlichem Maße bemerkbar ¹⁰⁷⁾. Deshalb stellte man sich in einem Versuch durch Ausschütteln eine Lösung von B 505 in Isoamylacetat mit einem Gehalt von etwa 1 µg pro ml her. Durch je 5 ml ließ man 3 Min. lang Stickstoff oder Sauerstoff perlen und beobachtete anschließend unter einer Analysenlampe im langwelligen UV-Licht die Fluoreszenz. Die mit Stickstoff begaste Probe fluoreszierte hell, die sauerstoffhaltige fast gar nicht. Durch

Zugabe von einigen Tropfen Diäthylamin konnte die Fluoreszenzlöschung vermindert werden. Nach Extrahieren in wenig Schwefelsäure, Zugabe von Lauge und anschließendem Zurückschütten in neues Isoamylacetat, wurde fast die gleiche Fluoreszenzintensität beobachtet wie in der mit Stickstoff begasten Vergleichslösung. Sauerstoff bzw. Luft löschte also die Fluoreszenz der freien Base sehr stark.

3.1.2.2. Abnahme der Fluoreszenz durch chemische Vorgänge

Wenn man die 6-Aminochinoline z.B. mit einem basischen Fließmittel auf einer Dünnschichtplatte chromatographierte, die Dünnschichtplatte an der Luft etwa eine halbe Stunde trocknen ließ und nochmals entwickelte, blieb an der Stelle, wo sich die Substanz nach der ersten Entwicklung befunden hatte, ein fluoreszierender Fleck zurück. Es wurde vermutet, daß die Substanz durch Luftsauerstoff oxidiert worden war¹⁰⁷⁾. Von den 6-Aminochinolininen wurde zu weiteren Versuchen B 505 ausgewählt, da es besonders empfindlich zu sein schien.

Da Oxidationen mit Sauerstoff meist radikalisch verlaufen, müßte die Reaktion durch Licht unterstützt werden können, um einen größeren Effekt zu sehen. Andererseits müßten Radikalfänger die Reaktion verlangsamen oder unterbinden. In einem Versuch wurden je 0,5 ml einer Lösung von B 505 - Base in Isoamylacetat, entsprechend 1,25 µg, in 8 Reagenzgläser mit Schliffstopfen pipettiert. Dazu wurden jeweils 4,5 ml Isoamylacetat gegeben, die mit Sauerstoff gesättigt waren. 4 Proben enthielten außerdem etwa 1 % BHT (Bis-tert.-butylhydroxytoluol) als Radikalfänger. Die eine Hälfte der verschlossenen Gläser wurde über Nacht in geringem Abstand unter einer Leuchtstofflampe bestrahlt, die andere Hälfte wurde ins Dunkle gestellt. Zur quantitativen Bestimmung wurde das B 505 mit Salzsäure ausgeschüttelt und anschließend durch Fluoreszenzmessung direkt auf der Dünnschichtplatte bestimmt, wobei die Ergebnisse der Doppel-

bestimmungen sehr gut beieinander lagen. Die im Dunkeln aufgehobenen Lösungen zeigten keinerlei Verlust an B 505. In den belichteten Proben, die BHT enthielten, wurden 30 % der zugesetzten Menge B 505 gefunden, und in den Proben ohne Zusatz nur noch 19 %.

Daraus ergab sich eindeutig, daß im Dunkeln Sauerstoff nicht mit der freien Base reagierte. Die entscheidende zerstörende Wirkung übte das Licht in Gegenwart von Sauerstoff aus, wahrscheinlich der von der Leuchtstofflampe abgegebene kurzwellige Anteil.

3.1.3. Fluoreszenzspektren und Fluoreszenzausbeuten von 6-Aminochinolinen und Primaquine in Lösung

Zur Messung der unkorrigierten Fluoreszenzspektren von Primaquine und den 6-Aminochinolinen in Lösung wählte man etwa die gleichen Lösungsmittel aus, die bei der Direktauswertung auf der Dünnschichtplatte vorlagen. Die 6-Aminochinoline II, III und B 505 wurden aus 1 ml wässriger Lösung des Salzes, die $5 \cdot 10^{-3}$ molar an Chinolinbase war, nach Alkalisieren mit 0,5 ml 2n Natronlauge in 5 ml Cyclohexan ausgeschüttelt. Vor der Messung wurde der Cyclohexanlösung 1 Tropfen Diäthylamin zugegeben. Primaquinediphosphat wurde gelöst in konz. H_2SO_4 ⁴⁸⁾ gemessen. Die Messungen wurden in 10^{-3} molarer Lösung mit dem ZEISS-Spektralfluorometer in 1 cm Quarzküvetten in Schrägstellung bei gleicher Geräteeinstellung ausgeführt. Zur Konstanthaltung der Meßbedingungen wurde die Fluoreszenz einer 10^{-3} molaren Lösung von POP = 2,5-Diphenyloxazol ¹⁶⁾ bei der Wellenzahl $27,4 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$ gemessen und bei möglichst kleiner Spaltbreite die Verstärkung so eingestellt, daß auf der Skala des Anzeigegegerätes 50 Skalenteile angezeigt wurden. Die unkorrigierten Fluoreszenzspektren wurden mit Hilfe einer für das benutzte Spektralfluorometer früher aufgestellten Korrekturtabelle ^{73, 16)} korrigiert (Abb. 3).

Abbildung 2

Fluoreszenzanregungsspektren

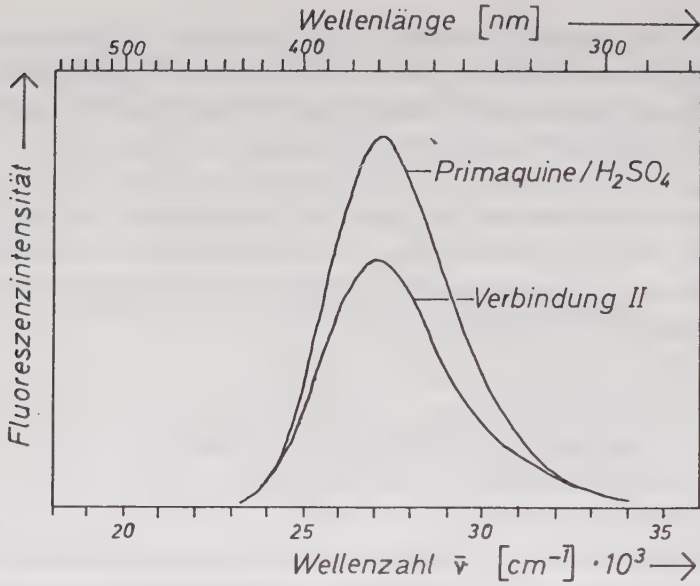
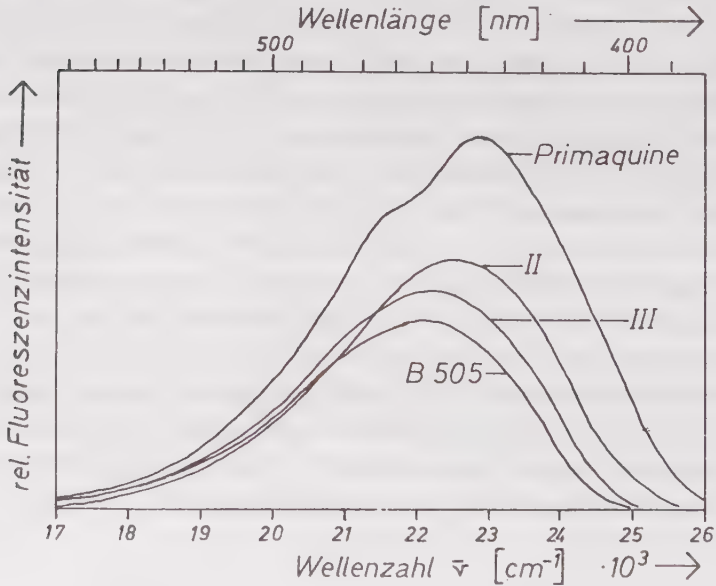


Abbildung 3

Korrigierte Fluoreszenzspektren



Da gleichzeitig auch das Fluoreszenzspektrum von POP gemessen wurde, konnte man die relative Fluoreszenzausbeute von Primaquine und den 6-Aminochinolininen bezogen auf POP ermitteln.

Die relative Fluoreszenzausbeute berechnete man entsprechend den Angaben von Förster³¹⁾ nach der Formel

$$\text{relat. Ausbeute in \%} = \frac{F(\text{Substanz}) \times n_2^2}{F(\text{POP}) \times n_1^2},$$

wobei F ein Maß für die Fläche unter der Kurve darstellt. n_1 bzw. n_2 ist der Berechnungsindex des jeweils verwendeten Lösungsmittels bezogen auf die Wellenlänge⁵⁹⁾ des Fluoreszenzmaximums.

Anstelle der UV-Absorptionsspektren wurden zur Ermittlung der maximalen Fluoreszenzanregung die Anregungsspektren in der Weise ermittelt, daß das Fluoreszenzlicht im Fluoreszenzmaximum in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Anregungslichtes als Skalenteile gemessen wurde (Abb. 2).

Tabelle 4

Maxima der korrigierten Fluoreszenzspektren, angegeben in Wellenzahl (WZ) und Wellenlänge (λ), und Fluoreszenzausbeuten, bezogen auf POP = 100 %.

Substanz	Anregung		Emission		relat. Ausbeute in %
	WZ in 10^3 cm ⁻¹	λ in nm	WZ in 10^3 cm ⁻¹	λ in nm	
Primaquine	27,2	368	22,9	436	61
B 505	26,8	373	22,1	452	29
III	26,9	372	22,2	450	34
IV	27,0	370	22,5	440	38

In Tab. 4 sind die Maxima der Fluoreszenzanregung (Abb. 2) und der korrigierten Fluoreszenzspektren (Abb. 3) sowie die berechneten relativen Fluoreszenzausbeuten der untersuchten Verbindungen aufgeführt.

3. 2. Direkte fluorometrische Bestimmung von Aminochinolin

3. 2. 1. Dünnschichtchromatographische Trennung von Aminochinolin

Wahl des Adsorbens für die Dünnschichtchromatographie, DC : Die Aminochinoline ließen sich auf Schichten aus Aluminiumoxid und Kieselgel gleich gut entwickeln. Fertigplatten waren ungeeignet, da sie eine viel zu hohe Untergrundfluoreszenz zeigten und Verunreinigungen enthielten ⁶⁸⁾. Am besten bewährten sich selbstgestrichene Platten, die mit Kieselgel HR "Merck" beschichtet wurden (siehe Abb. 5). Beim Streichen wurde sorgfältig darauf geachtet, die Schicht möglichst textulfaserfrei herzustellen ¹⁰⁰⁾. Obwohl das Kieselgel keine Bindemittel enthält, haftete es sehr fest an der Glasplatte. Bei einer Schichtdicke von 0,3 mm machten sich geringe Unebenheiten der Oberfläche beim späteren Auswerten kaum bemerkbar. Die fertigen Platten wurden vor Laborluft geschützt in einem Exsikkator aufbewahrt, da sie sonst schnell unbrauchbar wurden.

Wahl des Lösungsmittels zum Auftragen der Aminochinoline auf die Dünnschichtplatte : Da die Startflecken vor dem Entwickeln des Dünnschichtchromatogramms getrocknet werden mußten, war es wegen der Empfindlichkeit der nicht protonierten Aminochinoline gegenüber Luft und Licht ungünstig, sie als freie Basen in einem organischen Lösungsmittel auf die Schicht aufzutragen. Um die 6-Aminochinoline als Salze aufzutüpfeln zu können, mußten sie in einer Säure gelöst sein. Dazu eignete sich nur Salz-

säure, weil folgende Eigenschaften erwünscht waren: Die Säure sollte flüchtig sein, um den Überschuß vom Startfleck auf der Dünnschichtplatte entfernen zu können, und stark genug, damit die Aminochinoline quantitativ aus der organischen Phase extrahiert wurden; siehe auch Kapitel 3.3.4. Außerdem sollte sich die Säure mit dem organischen Extraktionsmittel nicht mischen. Zur Salzsäure mußte man kurz vor Gebrauch etwa 1 % Ascorbinsäure zusetzen, da sonst durch geringe Spuren oxidierender Begleitstoffe ein erheblicher Verlust von Substanz beobachtet wurde.

Ein weiterer Vorteil, die Verbindungen als Salze aufzutragen, bestand darin, daß die Aminochinoline als salzsaure Salze an der Auftragstelle vom Kieselgel festgehalten wurden. Der eigentliche Startfleck blieb dadurch auch bei einem großen Auftragsvolumen verhältnismäßig klein ⁹⁹⁾. Um die Entwicklung des Chromatogramms durch Feuchtigkeit bzw. Säure am Start nicht zu beeinträchtigen ⁸⁹⁾, war es unbedingt nötig, die Dünnschichtplatten im Wasserstrahlvakuum bei etwa 50° zu trocknen.

Wahl der Fließmittel: Die Aminochinoline lassen sich auf neutralen Kieselgelschichten mit basischen Fließmitteln entwickeln. Für die Aminochinoline mit einer tertiären Aminogruppe in der Seitenkette sind z. B. die Fließmittel Benzol/Diäthylamin (90 : 10) ⁷⁴⁾, Benzol/Aceton/Triäthylamin (20 : 20 : 1) ²⁾, Cyclohexan/Diäthylamin (80 : 20) oder (90 : 10) geeignet; darin steigen die R_F -Werte in der Reihenfolge II < Resochin < B 505 = III an. Um die primären Amine Primaquine und IV gut entwickeln zu können, muß das Fließmittel polarer sein, z. B. Cyclohexan/Aceton/Diäthylamin (68 : 18 : 14) oder Benzol/Chloroform/Diäthylamin (43 : 43 : 14).

Je schwächer basisch die verwendete Aminkomponente des Fließmittels ist, desto polarer müssen die übrigen Fließmittelbestandteile sein. Eine Polaritätszunahme des Fließmittels würde es mit sich bringen, daß die

aus biologischem Material eventuell mitextrahierten polaren Begleitstoffe nicht am Start zurückbleiben. Die Fließmittel wurden also aus möglichst unpolaren Komponenten mit einer starken Base zusammengesetzt. Andererseits sollten die Aminochinoline hRf-Werte zwischen 30 und 50 zeigen, um sie genügend weit vom Start abzutrennen, aber doch nicht so weit, daß ihre Auswertung durch eventuell auftretende unspezifische Fluoreszenz in der Nähe der Fließmittelfront gestört werden konnte. Weiterhin mußten die Komponenten leicht von fluoreszierenden Verunreinigungen befreit werden können, z. B. durch Destillation, sowie beim Entwickeln hinreichend stabil bleiben. Außerdem sollten die Komponenten möglichst wenig viskos sein, um die Chromatogramme in kurzer Zeit entwickeln zu können, und genügend flüchtig, um sie leicht vom Chromatogramm abdunsten zu können. Schließlich sollten die Fließmittel die Fluoreszenz nicht beeinträchtigen, sondern fördern, siehe Kap. 3.1.1. . Deshalb wurden die Aminochinoline mit tertiärer Aminogruppe in der Seitenkette mit der Kombination Cyclohexan / Diäthylamin entwickelt, siehe Tab. 5 . Für die stärker polaren Amine Primaquine und IV eignete sich das Chloroform-haltige Fließmittel besser als das mit Zusatz von Aceton, da es eine geringere Untergrundfluoreszenz verursachte.

Tabelle 5

Fließmittel zur DC auf Kieselgelschichten, die bei der quantitativen Bestimmung der Aminochinoline verwendet wurden. hRf-Werte : 30-50 .

Verbindung	Komponenten	Vol. -Verhältnisse
B 505	Cyclohexan/Diäthylamin	54 : 6
III	" / "	55 : 5
II	" / "	48 : 12
Resochin	" / "	45 : 15
Primaquine	Benzol/Chloroform/Diäthylamin	30 : 30 : 10
IV	" / " / "	30 : 30 : 10

Erst kurz vor dem Chromatographieren wurden die Fließmittel jeweils neu gemischt.

Entwicklung der Chromatogramme: Zum Entwickeln diente eine starkwandige Trennkammer. Da keine fluoreszierenden Stoffe eingeschleppt werden durften, wurde der Schliff der Trennkammer nicht mit dem üblichen Schmierfett abgedichtet, sondern man verwendete eine viskose Verreibung aus Kieselgel HR "Merck" mit Glyzerin, die sich nicht im Fließmittel lösen konnte und mit Wasser gut abwaschbar war. Aus dem gleichen Grund durfte die Trennkammer nicht mit Filtrierpapier ausgekleidet werden, wie sich in Versuchen zeigte. Um die Dünnschichtplatte trotzdem in einer mit Fließmittel gesättigten Atmosphäre und unter Luftausschluß entwickeln zu können, wurde die Trennkammer wie in Kap. 5.8. beschrieben, mit einer Vorrichtung nach Abb. 18 mit Stickstoff gefüllt.

3.2.2. Konstanthalten der Fluoreszenzintensität der Flecken auf dem Dünnschichtchromatogramm

Wenn man das entwickelte Chromatogramm kurze Zeit an der Luft trocknen ließ und anschließend die Fluoreszenz direkt auf der Schicht maß, wurde eine so schnelle laufende Verminderung der Fluoreszenzintensität beobachtet, daß eine verlässliche Auswertung unmöglich durchgeführt werden konnte: Innerhalb weniger Minuten, bei Resochin etwas langsamer, sank die Intensität auf einige Prozente des Ausgangswertes ab. Zunächst wurde vermutet, daß die Fluoreszenzfähigkeit der Aminochinoline nach dem Abdunsten des Fließmittels durch Adsorption an Kieselgel oder durch Feuchtigkeit aus der Luft ¹⁰⁰⁾ gestört wurde. Deshalb sprühte man verschiedene Flüssigkeiten mit hohem Siedepunkt, wie fl. Paraffin, Decalin, DMF, DMSO, Diglyme und Silikonöl, auf das Chromatogramm, um die Aminochinoline gegen äußere Einflüsse abzuschirmen ^{49) 53)} oder mög-

licherweise in Lösung ⁵¹⁾ zu halten. Dadurch konnte aber nur die Geschwindigkeit der Fluoreszenzabnahme etwas herabgesetzt werden. Da die 6-Aminochinoline in verdünnter saurer Lösung praktisch nicht fluoreszieren, nahm man an, daß sich nach dem Abdunsten des basischen Fließmittels salzartige Bindungen mit dem Kieselgel bilden könnten, wie sie von J o r k ⁵²⁾ für Morphin, Codein, Pyramidon u. a. festgestellt wurden. Ein Zusatz von Aminen zur aufgespritzten Flüssigkeit bewirkte ebenfalls nur eine geringe Verbesserung.

Schließlich wurde untersucht, ob die Luft für dieses Verhalten verantwortlich war. Um das Chromatogramm unter Luftausschluß messen zu können, wurde die entwickelte Dünnschichtplatte fließmittelfeucht noch innerhalb der Trennkammer mit einer im Versuchsteil, Kap. 5.1.1., beschriebenen Glasplatte zu einer "S" - Kammer vereinigt.

Wenn man nach dem Abdampfen des Fließmittels aus der Schicht bis zur Messung noch 20 Min. wartete, veränderte sich während der anschließenden, etwa halbstündigen Ausmessung des Chromatogramms die Fluoreszenzintensität der Flecken praktisch nicht. Die Fluoreszenz der Substanzflecken wurde von der Rückseite der Dünnschichtplatte her angeregt und gemessen.

Da das Glas der Dünnschichtplatte nur für Licht bis zu einer Wellenlänge von 350 nm durchlässig war, konnte Resochin, das mit der Hg-Linie bei 313 nm angeregt werden mußte, nicht in der "S" - Kammer bestimmt werden. Um diese Schwierigkeit zu überwinden, hätte man entweder Dünnschichtplatten aus Quarzglas oder anderem UV-durchlässigen Glas benutzen müssen oder man hätte die Schicht nach umständlicher Trocknung unter Stickstoff mit einer für UV-Licht durchlässigen, dünnen Platte zur Messung abdecken müssen. Bei der vorliegenden Arbeit behalf man sich, indem man das Fließmittel an der Luft nur unvollständig abdunstete und die Schicht sofort durch Auflegen einer Glasplatte vor weiterem Luftzutritt

schützte. Erst direkt vor der Messung verschob man die Glasplatte soweit, daß nur jeweils diejenige Bahn des Chromatogramms freigelegt wurde, die gerade gemessen werden sollte. Dieses Vorgehen führte nur zu befriedigenden Ergebnissen, wenn jede Bahn gleich behandelt wurde, weil die Fluoreszenz von Resochin in Abhängigkeit von der Trocknungszeit zunächst anstieg und dann langsam abfiel.

Primaquine, als freie Base, fluoreszierte unter den für die 6-Aminochinoline angegebenen Bedingungen auf der Dünnschichtplatte weniger intensiv als diese. Um es noch empfindlicher nachweisen zu können, wurde die ausgezeichnete Fluoreszenz in konz. H_2SO_4 herangezogen, wie sie für andere 8- und 4-Aminochinoline mit einer Methoxy-Gruppe in 6-Stellung von I r v i n ⁴⁸⁾ beschrieben wurde. Dazu trocknete man die entwickelte Dünnschichtplatte im Vakuum-Trockenschrank und tauchte sie in eine Mischung von konzentrierter Schwefelsäure mit Äther. Nach dem Abdunsten des Äthers mußte die Schicht ebenfalls mit einer Glasplatte abgedeckt werden, um ein Anziehen von Luftfeuchtigkeit zu unterbinden. Durch das Befeuchten der Schicht mit Schwefelsäure wurde gleichzeitig die Untergrundfluoreszenz wesentlich vermindert.

3.2.3. Messung der Fluoreszenz

Die Fluoreszenz wurde mit dem in Kap. 2.2.4. beschriebenen Auswertgerät gemessen. In der Regel verwendet man zur Fluoreszenzmessung eine kreisförmige Meßfläche, die etwas größer als der Substanzfleck gewählt wird ³⁹⁾. Zur Auswertung ungenügend getrennter oder inhomogener Flecken eignet sich eine spaltförmige Meßfläche besser, da sie ein höheres Ortsauflösungsvermögen besitzt.

R ö d e r ³⁹⁾ wies auf weitere Vorteile der Messung mit dem Spalt hin, die durch eigene Erfahrung bestätigt wurden. Wegen der kleineren Meß-

fläche ist die vom Empfänger registrierte Untergrundfluoreszenz niedriger. Da diese aber meistens die Empfindlichkeit des Meßverfahrens begrenzt, wird die Methode bei Anwendung eines Meßspaltes anstelle einer Kreisblende um etwa eine Zehnerpotenz empfindlicher.

Um die höchste Meßempfindlichkeit bei möglichst niedrigem Grundrauschen zu erreichen, wurde die Spaltblende verwendet und der Monochromatorspalt voll geöffnet. Dadurch brauchte man bei der üblichen Bestimmung von etwa 50 ng Substanz pro Fleck den Photostrom nur sehr wenig zu verstärken, um auf dem Schreiber bei empfindlichster Einstellung einen genügend großen Ausschlag zu erhalten. Der vom Plattenuntergrund herührende Ausschlag wurde durch Unterdrückung des Nullpunktes am Schreiber ausgeglichen. Die Geschwindigkeit des Kreuzzisches wählte man so, daß sich die Trägheit des registrierenden Systems nicht bemerkbar machen konnte.

Die Kreuzzischfläche hatte man durch Aufkleben einer Glasplatte vergrößert, damit die für die Messung von Primaquine und Resochin zum Abdecken der Schicht benötigte Glasplatte nicht herabfallen konnte.

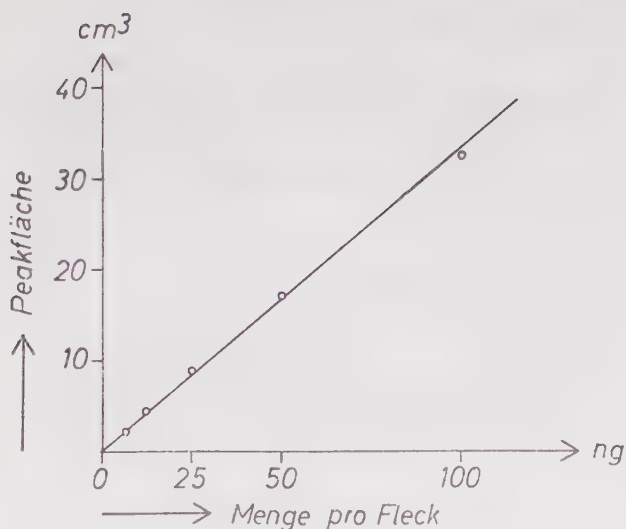
Mit Hilfe des angeschlossenen Kompensationsschreibers wurden die Fluoreszenzintensitäts-Ortskurven registriert, von denen in Abb. 5 einige wiedergegeben sind.

3.2.4. Linearer Meßbereich

Theoretisch ist die Fluoreszenzintensität der Stoffmenge proportional, in der Praxis gilt dieser Zusammenhang nur im Bereich bis zu μg -Mengen⁵⁵⁾. Zur Prüfung des Zusammenhanges zwischen Stoffmenge und Peakfläche, die der Fluoreszenzintensität proportional ist, wurde eine

salzsaure B 505 - Lösung, die 100 ng in 10 μ l enthielt, im Verhältnis 1 : 1 schrittweise weiterverdünnt. Von diesen Lösungen trug man je 10 μ l mit einer Kapillarpipette auf eine Dünnschichtplatte auf. Nach dem Chromatographieren wurden die Fluoreszenzintensitätsortskurven der Flecken registriert, die Basislinien eingezeichnet und die Peakflächen mit einem Polplanimeter ausgemessen. In Abb. 4 sind die Ergebnisse dargestellt.

Abbildung 4 Zusammenhang zwischen Stoffmenge und
Fluoreszenzintensität (Peakfläche) von B 505



Die Punkte sind Mittelwerte aus je 2 Bestimmungen. Im dargestellten Bereich war die Fluoreszenzintensität linear von der Stoffmenge abhängig.

3.2.5. Nachweisgrenze und Wahl des Meßbereichs für die quantitative Bestimmung

Verglich man die Peakflächen der Fluoreszenzintensitätsortskurven gleicher Mengen der 6-Aminochinoline B 505, III und II auf demselben Chromatogramm miteinander, so wurde ein Verhältnis von etwa 1,0 : 1,5 : 1,7 gefunden. Die übrigen Aminochinoline ließen sich wegen unterschiedlicher Meßbedingungen nicht direkt vergleichen. Die Nachweisgrenze wurde hauptsächlich vom Plattenuntergrund bestimmt. Sie lag für alle Verbindungen etwa bei 2 bis 4 ng pro Fleck. Geringere Mengen bis etwa 1 ng waren qualitativ noch zu erkennen.

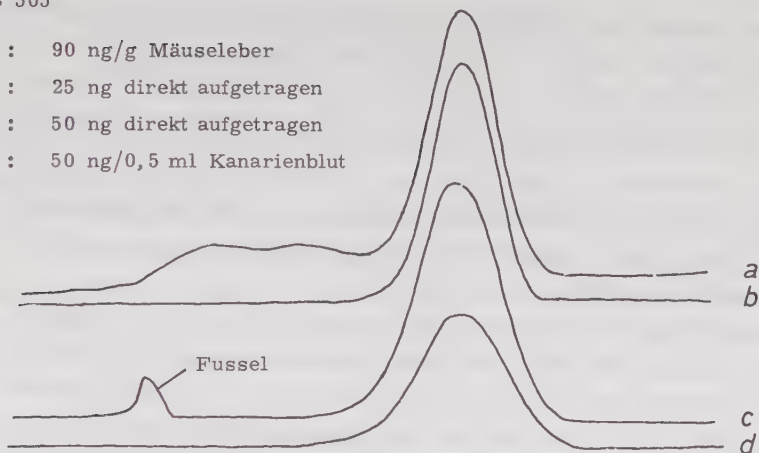
Die Peakfläche von 50 ng Substanz pro Fleck ließ sich noch sehr gut auswerten. Unter den dafür erforderlichen Meßbedingungen bildete der Plattenuntergrund bei der Aufzeichnung der Fluoreszenzintensitätsortskurve meistens eine gerade, waagrechte Linie.

In Abb. 5 sind einige Kurven wiedergegeben.

Abbildung 5 Fluoreszenzintensitätsortskurven,
Ausschnitte
← Laufrichtung des Fließmittels

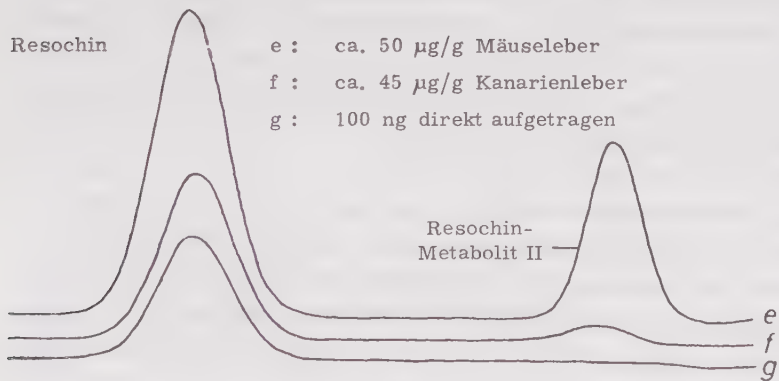
B 505

- a : 90 ng/g Mäuseleber
b : 25 ng direkt aufgetragen
c : 50 ng direkt aufgetragen
d : 50 ng/0,5 ml Kanarienblut



Resochin

- e : ca. 50 $\mu\text{g/g}$ Mäuseleber
f : ca. 45 $\mu\text{g/g}$ Kanarienleber
g : 100 ng direkt aufgetragen



Meßbedingungen, siehe auch Seite 114 und 115 :

		Fluoreszenz bei Verstärkung	Schreibbereich
B 505	a u. b :	560 nm I/10/1	2 mV
	c u. d :	480 nm I/ 1 /3	2 mV
Reso- chin	e u. g :	370 nm I / 1 / 8	10 mV

3.2.6. Reproduzierbarkeit der Bestimmung

Bei der planimetrischen Flächenbestimmung der von 50 ng Substanz verursachten Peaks wurden bei 2- bis 3-facher Wiederholung des Ausmessens Streuungen der Werte von $< 1 \%$ gefunden. Pataki⁷⁸⁾ gibt für die planimetrische Flächenbestimmung die gleiche Reproduzierbarkeit an.

Um die Fehlerbreite vom Auftragen der salzsauren Analysenlösungen auf die Dünnschichtplatte bis zur Ausmessung zu bestimmen, wurde folgender Versuch durchgeführt.

Von der im Kap. 5.6. beschriebenen B 505 - Lösung wurden 10 mal je 10 μ l, entsprechend 50 ng, mit einer Dosier-Kapillarpipette aufgetragen und chromatographiert. Zur Auswertung wurden nur 8 Flecken herangezogen, da 2 Peaks wegen deutlich erkennbarer Textilfasern in der Schicht nicht genau genug planimetriert werden konnten. Es ergab sich eine mittlere Peakfläche von 234 ± 10 Planimeteereinheiten (PE). Die Streuung des Mittelwertes betrug $s = \pm 3,6$ PE entsprechend $s_{\text{rel.}} = \pm 1,5 \%$. So geringe Streuungen wurden für die fluorometrische Direktauswertung anderer Verbindungen nur selten angegeben^{89) 69)}. Meist lag die relative Standardabweichung $s_{\text{rel.}}$ zwischen $\pm 3 - 6 \%$ ^{114, 57)}. Solche Übereinstimmung wurde nur für Werte beobachtet, die auf derselben Dünnschichtplatte gemessen wurden. Beim Vergleich der Peakflächen gleicher Substanzmengen, die auf verschiedenen Dünnschichtplatten chromatographiert und ausgewertet wurden, hat man erhebliche Unterschiede beobachtet. Deshalb durften die Analysenproben nur mit Hilfe einer Vergleichsprobe oder Vergleichslösung berechnet werden, die auf demselben Chromatogramm aufgetragen waren.

3.3. Aufarbeitung von biologischem Material

3.3.1. Gewinnung des biologischen Untersuchungsmaterials und Vorbereitung zur Extraktion

Blut: Von jedem Versuchstier sollte eine möglichst große Blutmenge erhalten werden können, um auch noch sehr niedrige Konzentrationen von Aminochinolininen zu erfassen. Als geeignete Methode zur Blutabnahme bei der Maus erwies sich die Eröffnung des retroorbitalen Venenplexus ³⁰⁾ in Äthernarkose, wobei 0,7 bis 1,5 ml Blut aufgefangen werden konnten. Beim Kanarienvogel bot sich die Blutabnahme aus der rechten Halsvene mit der Rekordspritze an, wobei man 0,7 bis 1,0 ml Blut erhielt.

Um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern, wurde es sofort mit Kaliumoxalatlösung gemischt. Verwendete man zum Blutauffangen Gefäße, an deren Wand Kaliumoxalat angetrocknet war ⁴⁴⁾, konnte eine Gerinnung nicht verhindert werden. Da die Gerinnung von Mäuseblut schon nach wenigen Sekunden einsetzt ⁹¹⁾, lösten sich die Kristalle wahrscheinlich zu langsam auf. Das von Kanarienvögeln erhaltene Blutvolumen mußte an der Teilung der Rekordspritze abgelesen werden. Um dabei die Meßungenauigkeit möglichst klein zu halten, wurden nur relativ große Blutmengen von etwa 0,5 ml abgenommen. Das Blut von Mäusen ließ sich dagegen sehr genau auswiegen, auch bei kleinen Mengen. Aus dem Gewicht errechnete man das Volumen, wobei die Dichte von Mäuseblut mit 1,03 der des Menschenblutes ⁴⁴⁾ willkürlich gleichgesetzt wurde.

Um den Inhalt der Erythrozyten mit dem Plasma möglichst gut zu mischen, mußte das Oxalat-Blut hämolysiert werden. Dazu eignete sich am besten wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

Exkremente: Das getrennte Auffangen von Kot und Urin ist beim Kanarienvogel praktisch nicht möglich und bei der Maus auch nur angenähert zu erreichen. Deshalb wurden die Exkreme

nte gemeinsam gesammelt. Die Ausscheidungen von Vögeln wurden auf einer Unterlage aus einer Glasfibrermatte aufgefangen. Mit Wasser vermischt reagierten sie neutral, der Kot der Mäuse dagegen zeigte basische Reaktion. Da die Chinolin-Basen als freie Amine unbeständig sind, wurden die Exkreme

nte der Mäuse in einer Glasschale, die 0,8 %ige Schwefelsäure enthielt, aufgefangen. Ein weiterer Zusatz von Ascorbinsäure, der die Aminochinoline vor möglicher Oxidation schützen sollte, bewirkte im Gegenteil eine sehr starke Einbuße an wiederfindbarer Substanz. Vor der Extraktion der Exkreme

nte wurden sie homogenisiert, wobei man den Vogelkot zusammen mit der Glasfibrermatte in 0,8 %ige Schwefelsäure zerkleinerte.

Leber: Die Lebern wurden den mit Äther narkotisierten oder getöteten Tieren entfernt, mit Wasser abgewaschen, mit Filterpapier abgetrocknet und ohne Gallenblase nach dem Wiegen sofort mit Trockeneis tiefgefroren, um eine mögliche Veränderung der Aminochinoline zu verhindern. Allerdings konnte in einem Versuch, bei dem ein Teil der Leber etwa 1 Stunde bei Zimmertemperatur aufbewahrt wurde, keine Verminderung im Gehalt gegenüber dem anderen, sofort tiefgefrorenen Teil festgestellt werden.

Das Homogenisieren von Gewebe wird im allgemeinen in saurem Milieu durchgeführt, um die basischen Stoffe möglichst vollständig in Lösung zu bringen. Beim Nachweis von kleinen Mengen Resochin wurde von verschiedenen Autoren Lebergewebe in der doppelten bis 100-fachen Menge 0,1 n HCl homogenisiert^{4, 86, 32)}. Um das Endvolumen möglichst klein zu halten, wurde in eigenen Versuchen das Lebergewebe in der gleichen bis doppelten Flüssigkeitsmenge zerkleinert. Es erwies sich dabei als günstig, statt 2n Salzsäure isotone NaCl-Lösung zu verwenden. Dadurch wurde eine Ausfällung von Eiweißbestandteilen verhindert, was zum Einschluß von Aminochinolin

en hätte führen können.

3.3.2. Wahl des Extraktionsmittels

Die Auswahl des organischen Lösungsmittels, mit dem die Proben extrahiert werden sollten, wurde hauptsächlich nach folgenden Gesichtspunkten vorgenommen. Das Lösungsmittel sollte

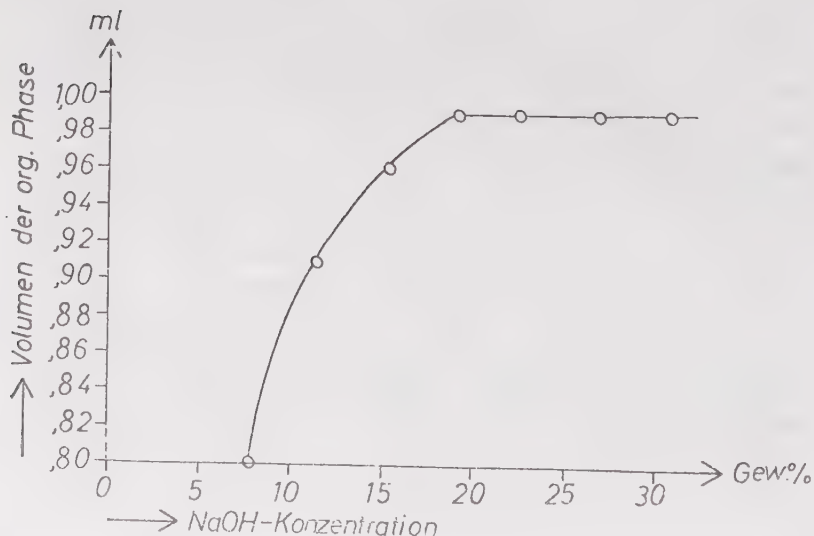
1. sehr gut und unspezifisch extrahieren, um auch mögliche polare Metaboliten zu erfassen;
2. sich nicht mit Wasser mischen, um z.B. eine Volumenänderung zu vermeiden;
3. einen hohen Siedepunkt besitzen, um es u. a. sicher pipettieren zu können;
4. gegen Säuren und Laugen beständig sein;
5. inert und gut haltbar sein;
6. leichter als Wasser sein, um das weitere Aufarbeiten mit Hilfe der Ampulle zu ermöglichen.

Ein Lösungsmittel, das alle aufgeführten Eigenschaften besitzt, wurde nicht gefunden. Von den chlorierten Kohlenwasserstoffen erfüllte das Äthylenchlorid alle Forderungen, außer der letzten. In Versuchen ergab sich, daß höhere Alkohole zu viskos waren oder zu viele Begleitstoffe extrahierten. Höhere Äther wurden nicht weiter in Betracht gezogen, da sie zu ausgeprägter Peroxidbildung neigen.

Angeregt durch die Methode zur Isolierung basischer Suchtmittel aus Harn von H. J a t z k e w i t z ⁵⁰⁾ wurde Isoamylacetat ausgewählt. Es extrahiert u. a. malariawirksame Aminochinoline ^{35a, 35c, 35d)} ausgezeichnet, ist nur zu etwa 0,3 % in Wasser von 20°C löslich, siedet bei 142°C, ist chemisch inert gegenüber Aminochinolinen, ist haltbar und hat eine Dichte von 0,86. Demnach entsprach es sehr gut allen aufgeführten Bedingungen außer einer: als Ester läßt sich Isoamylacetat mit Lauge verseifen.

Bei den Versuchen, das Ausmaß der Verseifung zu bestimmen, ergab sich überraschenderweise, daß mit steigender Konzentration der Natronlauge die Verseifungsgeschwindigkeit verlangsamt bzw. der verseifte Anteil des Esters weniger wurde. Als Maß für die Hydrolyse diente die Volumenverminderung, da ein ml Ester bei vollständiger Umsetzung 0,72 ml in Wasser kaum löslichen Isoamylalkohol ergibt. Um festzustellen, wie weit die Verseifung unterdrückt werden konnte, wurde folgender Versuch durchgeführt. Je 1,00 ml Isoamylacetat und 6,0 ml Natronlauge unterschiedlicher Konzentration wurden in einem Reagenzglas mit Schliffstopfen 1 Stunde lang unter gleichen Bedingungen geschüttelt. Das Volumen der organischen Phase bestimmte man mit einer Pipette. Die übriggebliebenen Volumina sind in Abb. 6 gegen die Konzentration der Natronlauge aufgetragen. Bei Laugenkonzentrationen von etwa 20 Gewichtsprozent und darüber trat praktisch keine Hydrolyse mehr auf.

Abbildung 6 Alkalische Verseifung von Isoamylacetat in Abhängigkeit von der Laugenkonzentration



Auf der Suche nach einer Erklärung für dieses Verhalten wurde im G m e l i n 'schen Handbuch ⁴¹⁾ im Artikel über Natronlauge ein analoges Beispiel gefunden. Aus Schwefelkohlenstoff, CS_2 , wird in wässriger Natronlauge Na_2CS_3 gebildet, wobei die gleiche Abhängigkeit des Umsatzes von der Konzentration der Lauge beobachtet wird. Es werden zwei Deutungen gegeben: Ein Untersucher nimmt zur Erklärung an, daß die Verseifung von CS_2 über ein Zwischenprodukt mit H_2O verläuft, das mit steigendem Gehalt an NaOH durch Hydratbildung gebunden wird; ein anderer weist auf die abnehmende Löslichkeit von CS_2 in Natronlauge hin, wenn ihre Konzentration zunimmt.

Beim Schütteln von Isoamylacetat mit Puffer-Lösung, pH 9,3, wurde keine Veränderung der organischen Phase festgestellt. Auf Grund dieser Ergebnisse war es erlaubt, Isoamylacetat als Extraktionsmittel längere Zeit zum Extrahieren mit basischer Lösung zu schütteln, wenn die wässrige Vorlage entweder nur einen pH von 9,3 hatte oder mindestens 20-prozentige (g/g) Natronlauge war.

3.3.3. Wahl der Extraktionsbedingungen

Beim Schütteln des hämolysierten Oxalatblutes mit einer etwa gleichen Menge eines organischen Lösungsmittels bildeten sich sehr stabile Emulsionen, die durch starkes Zentrifugieren nur teilweise zerstört werden konnten. In der organischen Phase blieb häufig ein stabiles, gelartiges Gerüst zurück. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, hätte man das Volumen der organischen Phase vergrößern oder vorher das Eiweiß fällen können. In beiden Fällen hätte man ein großes Volumen an organischem Extrakt erhalten, dessen weitere Aufarbeitung problematisch schien. Außerdem wäre bei der Enteiweißung für jedes Aminochinolin vielleicht ein anderes Fällungsreagenz nötig gewesen ¹⁰⁷⁾. Es zeigte sich, daß die Emulsionsstabilität geringer wurde, wenn man das hämolysierte Oxalatblut zu-

vor scharf zentrifugierte. Dadurch wurden hauptsächlich die leeren Hüllen der Blutkörperchen und die Kerne der Vogelerythrozyten abgetrennt. In Versuchen, bei denen Substanzen vor bzw. nach dem Zentrifugieren zum Oxalatblut zugesetzt wurden, konnte keine Beeinträchtigung der Wiederfindung festgestellt werden. Die Entstehung eines praktisch nicht zentrifugierbaren Gelgerüsts in der organischen Phase konnte durch anfängliches, vorsichtiges Übereinanderschichten der Phasen unterdrückt werden, wie es auch von Brodie⁴⁾ bei der Extraktion aus Plasma beschrieben wurde. Wenn es die Konzentration an Aminochinolinen zuließ, wurde das hämolysierte und zentrifugierte Oxalatblut mit Oxalatlösung so verdünnt, daß keine Störungen beim Extrahieren mehr auftraten.

Zum Alkalisieren von hämolysiertem und zentrifugiertem Oxalatblut war starke Lauge, wahrscheinlich durch Fällung von Eiweiß bedingt, nicht so gut geeignet wie eine Boratpufferlösung von pH 9,3, mit der in Zusatzversuchen eine bessere Wiederfindungsrate erhalten wurde. Da die Pufferkapazität durch die geringe Löslichkeit des Borats begrenzt war, wurde die aufgearbeitete Blutmenge auf 0,5 ml im Oxalatblut pro 2 ml Pufferlösung beschränkt. Bei diesem Verhältnis erniedrigte sich der pH-Wert nach halbstündigem Schütteln in Anwesenheit von Isoamylacetat von 9,25 auf 8,85. Dieser niedrige pH-Wert reichte zum Extrahieren der Aminochinoline mit einem so polaren Lösungsmittel wie Isoamylacetat noch aus, wie durch Zusatzversuche festgestellt wurde. Nach Brodie läßt sich Resochin bei pH 9 mit dem unpolaren n-Heptan nur zu 70 % aus wässriger Lösung ausschütteln, während er mit Äthylenchlorid 100 % erhielt⁴⁾.

Die homogenisierten Lebern und Exkremente wurden vor dem Extrahieren unter Kühlung mit genügend 50 %iger (g/g) Natronlauge versetzt, um das Gesamtvolumen möglichst klein zu halten. Damit erreichte man gleichzeitig eine hohe Dichte der wässrigen Phase, wodurch das Brechen der

Emulsion nach dem Schütteln erleichtert wurde.

Die zur Extraktion aus organischem Material verwendete Menge Isoamylacetat wurde so bemessen, daß sich die beim Schütteln bildende Emulsion durch Zentrifugieren noch ausreichend zerstören ließ. Da bei der Extraktion der Proben nicht unter Lichtausschluß gearbeitet wurde, setzte man dem Isoamylacetat etwa 0,2 % BHT zu. Als weitere Schutzmaßnahmen gab man kurz vor dem Alkalisieren wenig Ascorbinsäure in den Ansatz und leitete in das Extraktionsgefäß N_2 ein, obwohl ein eindeutiger Schutzeffekt nicht nachgewiesen werden konnte.

Zum möglichst vollständigen Extrahieren von Blut genügte es, die alkalisierten Ansätze eine halbe Stunde lang mit Isoamylacetat zu schütteln, wobei die Ausbildung einer stabilen Emulsion durch langsames Schütteln auf einer Maschine mit kreisender Bewegung verhindert wurde. Die Homogenisate von Exkrementen und Lebergewebe mußten dagegen nach Zusatz von Isoamylacetat und Lauge 1 Stunde lang heftig geschüttelt werden, da sie viskose Emulsionen bildeten. Längeres Schütteln brachte keine besseren Ergebnisse, dagegen war es vorteilhaft, die mit Isoamylacetat gemischten Homogenisate vor dem Alkalisieren 2 Min. lang in ein Ultraschallbad zu halten.

3.3.4. Anreicherung der Aminochinoline durch Ausschütteln der organischen Phase mit Säure

Da auf die Dünnschichtplatte nur eine sehr geringe Flüssigkeitsmenge, höchstens 50 μ l pro Startfleck, aufgetragen werden konnte, mußten die Aminochinoline in einem möglichst kleinen Volumen angereichert werden können. Eigene Versuche, den organischen Extrakt unter Zusatz von wenig Essigsäure einzulegen⁴²⁾, brachten keine befriedigenden Er-

gebnisse. Außerdem war es schwierig, das Endvolumen jeweils genau zu messen. Deshalb schien es günstiger zu sein, die organische Phase mit wässriger Salzsäure zu extrahieren.

Beim Schütteln von Isoamylacetat mit Salzsäure, wobei das Mengenverhältnis und die Säurekonzentration stark variiert wurden, traten praktisch keine Volumenänderungen auf. Das Volumen der Salzsäure wählte man so aus, daß sich nach dem Extrahieren immer etwa die gleiche Konzentration von Aminochinolin in der salzsauren Lösung ergab. Dadurch war es möglich, stets vergleichbare Substanzmengen in gleichen Volumina auf die Dünnschichtplatte aufzutragen.

Bei hohem Gehalt von Aminochinolin in der organischen Phase war das an Salzsäure benötigte Volumen so groß, daß zum Ausschütteln ohne weiteres ein Zentrifugierglas mit Schliffstopfen verwendet werden konnte, wobei eine Salzsäurekonzentration von 7 % ausreichte. Zum Auftragen auf die Dünnschichtplatte wurde von der salzsauren Lösung nur ein sehr kleiner Anteil, meistens 10 μ l pro Startfleck, benötigt. Der größte Teil der Substanz wurde also nicht zur Auswertung herangezogen.

Lag der Aminochinolingehalt in der organischen Phase dagegen sehr niedrig, mußte sie mit einem so geringen Volumen an Salzsäure ausgeschüttelt werden, daß ein quantitatives Arbeiten im Zentrifugierglas mit Schliff nicht möglich war, da die wässrige, salzsaure Lösung z.T. in den Schliffspalt gezogen wurde und sich praktisch nicht pipettieren ließ. Außerdem war es wünschenswert, die gesamte Substanzmenge, die sich in der organischen Phase befand, zur Messung verwenden zu können.

Das bedeutete, daß die zum Ausschütteln verwendete wässrige Phase, etwa 20 - 50 μ l Salzsäure, möglichst quantitativ auf die Dünnschichtplatte übertragen werden mußte. Diese Forderung schien am besten erfüllt zu

werden, wenn man dasselbe Gefäß, in dem die Extraktion ausgeführt wurde, als Pipette zum Auftragen der salzsauren Lösung auf die Dünnschichtplatte verwenden konnte.

Schließlich wurde für dieses Problem folgende Lösung gefunden, die den gestellten Anforderungen weitgehend entsprach. Man pipettierte die organische Phase und die Salzsäure in eine Ampulle aus leicht schmelzendem Glas, wie sie für Injektionslösungen verwendet werden. Anschließend wurde das obere Ende des Ampullenspießes nicht, wie üblich, rund abgeschmolzen, sondern zu einer dünnen Kapillare ausgezogen, die dann erst in der Flamme verschlossen wurde, siehe Abb. 16. Nach dem Schütteln, wobei keine Flüssigkeit verloren gehen konnte, wurde die Ampulle mit der Spitze nach unten zentrifugiert. Dabei sammelte sich die salzsaure Lösung in der Spitze an. Mit einer Feile wurde die Ampulle an der Verengung angeritzt, der Ampullenkörper abgebrochen und verworfen. Wenn man nun die äußerste Spitze der Kapillare vorsichtig abbrach und auf die Dünnschichtplatte aufsetzte, wurde die salzsaure Lösung durch Kapillarkräfte praktisch vollständig herausgesaugt. Auf diese Weise konnte die in 2,5 ml organischer Phase enthaltene Menge an Substanz mit etwa 20 µl wässriger Salzsäure extrahiert und auf einen Startfleck aufgetragen werden.

Da das Lumen der Kapillare an der Bruchstelle meist unterschiedlich weit war, lief die salzsaure Lösung nicht immer in gleicher Weise aus, so daß die Substanzenverteilung pro Startfleck etwas variierte. K l a u s ⁵⁵⁾ wies nach, daß sich bei fluorometrischer Direktauswertung, besonders bei rechteckigem Meßspalt, Inhomogenitäten im Meßfleck praktisch nicht störend bemerkbar machen.

Um möglichen Substanzverlusten durch Adsorption an Glasoberflächen vorzubeugen ¹⁰⁷⁾, wurde die organische Phase stets mit Pipetten abgemessen, die zuvor mit etwa 5 ml Isoamylacetat unter Zusatz eines Tropfens

Diäthylamin gespült wurden. Da Luftsauerstoff eventuell stören konnte, begaste man die Ampulle vor dem Einfüllen der Flüssigkeiten mit CO_2 . Beide Vorsichtsmaßnahmen hatten keinen negativen Einfluß auf das Ausschüttelergebnis.

Das Mischen der beiden Phasen in der Ampulle bereitete zunächst Schwierigkeiten. Obwohl die Ampulle manuell oder maschinell möglichst kräftig geschüttelt wurde, ließen sich die geringen Substanzmengen nicht vollständig extrahieren. Da vermutet wurde, daß sich die Säuretröpfchen nicht genügend zerteilten, wurde die Ampulle schließlich in ein Ultraschall-Reinigungsbad gehalten. Innerhalb weniger Sekunden bildete sich eine feine Emulsion. Die Extraktion gelang nun praktisch vollständig, wenn die Substanz zuvor aus Vergleichsproben ohne Zusatz von biologischem Material (Wasserwert) ausgeschüttelt worden war.

Bei den ersten Vergleichsproben mit Blutzusatz wurde nur ein Teil der eingesetzten Substanzmenge wiedergefunden, obwohl die Konzentration an HCl in der wässrigen Phase mit 20 % genügend hoch war. Außerdem bildete sich in der wässrigen Phase abhängig von der Blutmenge eine gelartige Emulsion, die das Auslaufen der salzsauren Lösung stark behinderte. Der Meniskus der salzsauren Lösung, der beim Wasserwert konkav war, zeigte nun nach der Aufarbeitung von Blut eine konvexe Wölbung. Um festzustellen, bei welchem der beiden Extraktionsschritte, vom Blut in das Isoamylacetat oder von der organischen Phase in die wässrige Säure, die Substanz zurückgehalten wurde, schüttelte man Blut mit Isoamylacetat aus und setzte die Substanz der organischen Phase als Base zu. Dabei ergab sich, daß aus dem Blut extrahierbare Stoffe ein vollständiges Ausschütteln in die salzsaure Lösung verhinderten. Wegen der Umkehrung der Meniskuskrümmung der salzsauren Lösung wurde zunächst vermutet, daß die Änderungen der Oberflächenspannungen diesen Effekt bedingten. Durch Zugabe von Tensiden zur wässrigen Salzsäure wurde aber im wesentlichen nur erreicht, daß

die gelartige Emulsion in der Ampullenspitze das Auslaufen der sauren Lösung weniger behinderte, so daß die Wiederfindung etwas besser wurde.

Bei weiterer Untersuchung stellte sich heraus, daß durch Waschen der aus Blut gewonnenen organischen Phase mit dem gleichen Volumen 20 %iger Natronlauge die Wiederfindung der Aminochinoline wesentlich verbessert werden konnte. Gleichzeitig bildeten sich in der salzsauren Lösung auch keine stabilen Emulsionen mehr aus. Durch das Schütteln mit der starken Lauge mußte die störende Substanz wieder entfernt worden sein. Aus diesen Ergebnissen ließ sich folgender Schluß ziehen: Im Blut war ein sauer reagierender Stoff enthalten, der bei pH 9 in die organische Phase extrahiert wurde. Dieser Stoff bildete mit den Aminochinolin eine salzartige Verbindung, die lipophiler war als ihre Komponenten für sich allein ⁺⁾ . Durch Schütteln mit wenig wässriger Salzsäure ließ sich der Basenanteil der salzartigen Verbindung nur unvollständig abtrennen, dagegen konnte der Säureanteil bei pH 14-15 aus der organischen Phase entfernt werden. Wie ein intensives Literaturstudium ergab, wurde von Brodie beim Ausschütteln von basischen Substanzen aus Blutplasma die gleiche Erfahrung gemacht ⁴⁾ .

3.4. Überprüfung der Analysenmethode

3.4.1. Reproduzierbarkeit bei gleichzeitiger Aufarbeitung identischer Blutproben

Als Prüfung zur Reproduzierbarkeit der Analysenmethode wurde zunächst die Fehlerbreite beim Aufarbeiten von Blut untersucht, wenn 2 bis 3

⁺⁾ Diesen Effekt nutzt man bei der Ionenpaar-Extraktion aus.

gleiche Anteile derselben Blutprobe parallel aufgearbeitet und auf einem Chromatogramm ausgewertet wurden. Pro Anteil verwendete man etwa 0,5 ml Mäuseblut, das mit Kaliumoxalatlösung auf 2,0 ml verdünnt war und etwa 50 ng Verbindung III oder B 505 enthielt. Jede Teilprobe wurde nach der Aufarbeitung mit Hilfe einer Ampulle auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Die aus 15 Doppel- oder Dreifachbestimmungen erhaltenen Peakflächen schwankten im Mittel um etwa 3,5 % um ihren jeweiligen Mittelwert. Als Streuung dieser Angabe wurde $\pm 2,2$ % berechnet. Gegenüber dem in Kap. 3.2.6. mit reiner Substanzlösung ausgeführten Versuch ließen sich die zusätzlichen Arbeitsgänge wie Pipettieren, Extrahieren aus Blut, Waschen der organischen Phase und Ausschütteln in einer Ampulle mit genügender Genauigkeit gleichzeitig reproduzieren. Das bedeutete, daß beim parallelen Aufarbeiten von Anteilen einer Blutprobe jeweils unter praktisch gleichen Bedingungen gearbeitet wurde.

3.4.2. Ausbeute in Zusatzversuchen

Um festzustellen, mit welchem Erfolg die Aminochinoline nach den angegebenen Methoden extrahiert und bestimmt wurden, setzte man Substanz sowohl wässriger Lösung als auch biologischem Material zu und bestimmte jeweils die Ausbeute der Wiederfindung. Sollte die Substanz zu Exkrementen oder Leber zugesetzt werden, verdünnte man die Injektionslösung (Kap. 5.1.7.) mit 0,1 n H_2SO_4 , die 0,9 % NaCl enthielt, um Adsorptionsverluste zu vermeiden. Für die Zugabe zu Blut wurde sie mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt.

Die zugegebenen Substanzmengen wurden so gewählt, daß sich Konzentrationen ergaben, wie sie in Analysenproben mit mittlerem bis niedrigem Gehalt an Aminochinolinen gefunden wurden. Die Proben mit zugesetzter Substanz arbeitete man entsprechend den Vorschriften für Analysenproben

auf (Kap. 5).

Die in den Tabellen 6, 7 und 8 verzeichneten Zusatzversuche für eine Substanz führte man zu verschiedenen Zeiten unabhängig voneinander aus. Auf diese Weise wurde die absolute Ausbeute bestimmt. Die in den Tabellen angegebenen Einzelwerte (EW) für die Ausbeute stellen die Mittelwerte aus den Meßergebnissen von 3 oder 4 Flecken eines Chromatogramms dar. Aus den Einzelwerten wurde der Mittelwert (MW) berechnet.

Blut: In Tab. 6 sind die Ausbeuten von zu Oxalatlösung oder Oxalatblut zugesetzter Substanz wiedergegeben. Die angeführten Substanzmengen waren jeweils in 2 ml Oxalatlösung oder Oxalatblut enthalten, wobei zur Herstellung des Oxalatblutes frisches Mäuseblut auf das vierfache Volumen mit Kaliumoxalatlösung verdünnt wurde.

Tabelle 6 Blut,
Ausbeute in % der zugesetzten Menge

aus Oxalat-Lösung				aus Oxalatblut			
Verbindung	Menge ng	EW	MW	Verbindung	Menge ng	EW	MW
III	50	85		III	50	67	
III	50	84		III	50	90	
III	50	69		III	50	76	78
III	50	81		B 505	12,5	81	
III	50	83		B 505	12,5	60	70,5
III	50	82		B 505	100	78	
III	50	80		B 505	50	68	
III	50	88	81,5	B 505	50	73	73

EW = Einzelwert, MW = Mittelwert

Exkremente: Die Substanz, je 25 µg, wurde bei der Untersuchung von Exkrementen der Mäuse in die vorgelegte Schwefelsäure pipettiert. In dieser Lösung wurden 24 Stunden lang die Ausscheidungen von 5 gesunden Mäusen aufgefangen. Um unter diesen Bedingungen die Beständigkeit der

Tabelle 7 Exkremente,

Ausbeute in % der zugesetzten Menge (25 µg)

aus Vogel-Exkrementen			aus Mäuse-Exkrementen		
Verbindung	Einzelwert	Mittelwert	Verbindung	Einzelwert	Mittelwert
II	47		II	50	
II	60		II	60	
II	53	53	II	74	61
aus 0,8 %iger Schwefelsäure ("Wasserwert")			B 505	60	
			B 505	62	
B 505	85		B 505	50	
B 505	87		B 505	51	
B 505	92	88	B 505	57	
			B 505	61	56

Zur Berechnung der Analysen verwendete mittlere Ausbeute (R) : 57 %

Substanzen bzw. die Ausbeute ohne Einfluß von Exkrementen zu bestimmen, ließ man die Vorlage mit den zugesetzten Aminochinolin in einigen Versuchen nur 24 Stunden lang im Mäuseraum stehen, ohne Ausscheidungen aufzufangen ("Wasserwert"). Die Exkemente von Kanarienvögeln wurden gleichfalls 24 Stunden lang von 5 unbehandelten Tieren gesammelt. Die Substanzlösung gab man vor dem Homogenisieren zur 0,8 %igen Schwefelsäure dazu.

Leber: Die Aminochipoline mischte man mit der Kochsalzlösung, die zum Homogenisieren von Lebergewebe verwendet wurde. Die zugesetzte Menge war für die einzelnen Substanzen sehr unterschiedlich. In Tab. 8 sind die Ergebnisse der Versuche mit Mäuseleber angegeben.

Tabelle 8 Lebergewebe,
Ausbeute in % der zugesetzten Menge

Verbindung	Menge μ g	in Lebergewebe g	Einzelwert	Mittelwert (R)
B 505	0,125	2,3	70	
B 505	0,175	5,0	66	
B 505	0,175	5,9	53	62

III	10,0	3,0	95	
III	10,0	3,0	95	95

Resochin	100	5,8	81	
Resochin	100	5,0	76	
Resochin	100	5,5	71	
Resochin	100	5,4	63	73

4. T i e r v e r s u c h e

4. 1. Durchführung der Versuche

Um die biologische Streuung der Einzelergebnisse möglichst klein zu halten, wurde jede Analysenprobe von 4, meistens 5, Tieren gewonnen.

4. 1. 1. Dosierung der Aminochinoline

Die Dosierung der Aminochinoline wurde nach 3 verschiedenen Gesichtspunkten ausgewählt:

1. Sie sollte nicht im toxischen Bereich liegen, um eine ungestörte Elimination beobachten zu können ¹⁸⁾.
2. Die Dosierung sollte für alle Substanzen gleich groß sein, damit die Ergebnisse untereinander besser vergleichbar waren.
3. Die in den Analysenproben enthaltene Substanzmenge sollte über einen möglichst großen Zeitraum nachweisbar sein.

Wegen der erheblichen Unterschiede in der Verträglichkeit und biologischen Halbwertszeit der Substanzen ließen sich diese Forderungen nur bei der Untersuchung von Exkrementen gleichzeitig erfüllen. Die im einzelnen verwendeten Dosierungen sind in den Tabellen in Abschnitt 4. 2. 2. aufgeführt.

4. 1. 2. Applikation der Aminochinoline

Die Substanzen wurden jeweils nur einmal appliziert.

Da die biologische Halbwertszeit und die Konzentration im Lebergewebe und Exkrementen möglichst unabhängig vom Resorptionsverhalten der Substanz bestimmt werden sollte, wurde sie den Kanarienvögeln intravenös injiziert, in die rechte Halsvene. Bei Mäusen läßt sich eine i. v. - Injektion

nicht so einfach durchführen, deshalb wurde ihnen die Substanz intraperitoneal injiziert. Nach D o s t ist dieses Vorgehen erlaubt, wenn die Resorption wesentlich schneller verläuft als die Elimination, was für die meisten Verbindungen zutrifft ¹⁸⁾ und für die untersuchten Aminochinoline bestätigt werden konnte: Die nach i. v. -Injektion der Verbindungen II und III nach 2 bzw. 4 Stunden gefundenen Konzentrationen in Mäuseblut unterschieden sich praktisch nicht von den Blutspiegeln, die nach i. p. Injektion erhalten wurden (siehe Abb.10,11). Weiterhin mußte die Resorption der Substanzen bei i. p. -Injektion sehr rasch erfolgen, da sich das Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und Gewebe innerhalb weniger Minuten einstellte (Kap. 4.2.2.1.).

4.1.3. Verdünnung der Analysenproben bei der Aufarbeitung

Um von allen Analysenproben Startflecken mit einem Gehalt um 50 ng Substanz zu erhalten, wurden die Proben während der Aufarbeitung entsprechend verdünnt. Blutproben, die immer mit Hilfe einer Ampulle aufgearbeitet wurden, verdünnte man vor der Extraktion mit Oxalatlösung. Bei der Untersuchung von Exkrementen und Lebergewebe stellte man die salzsaure Analysenlösung, die chromatographiert wurde, auf den gewünschten Gehalt ein, indem man das Volumenverhältnis von organischer Phase zu wässriger Salzsäure variierte.

4.1.4. Berechnung der Analysen

Wie in Kap. 3.2.4. gezeigt wurde, sind im angegebenen Konzentrationsbereich die Peakflächen den Stoffmengen direkt proportional. Als Bezugswert zur Berechnung der Analysen dienten die Peakflächen von 3 - 4 Vergleichsflecken mit bekanntem Gehalt als äußerer Standard. Bei der Aufarbeitung von Exkrementen und Lebergewebe wurden je 10 µl einer salz-

sauren Lösung der Aminochinoline, gleich 50 ng Substanz, als Bezugswert auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Die pro Fleck bzw. Volumen der aufgetragenen salzsauren Analysenlösung berechnete Substanzmenge wurde entsprechend der beim Aufarbeiten erfolgten Verdünnung auf den Gehalt der Analysenprobe umgerechnet. Durch Berücksichtigung der mittleren Ausbeuten in Zusatzversuchen aus den Tabellen 7 und 8 wurde dieser Gehalt korrigiert.

Als Bezugswert bei der Analyse von Oxalatblut verwendete man immer eine parallel aufgearbeitete Vergleichsprobe. Diese enthielt etwa die gleiche Blut- und Substanzmenge wie die Analysenprobe. Unter der Annahme, daß die Ausbeute bei paralleler Aufarbeitung ebenfalls gleich ist, wurde der Gehalt der Analysenprobe direkt aus dem Verhältnis der Peakflächen berechnet.

4.2. Meßergebnisse

4.2.1. Metaboliten der Aminochinoline

Obwohl nur die unveränderten Aminochinoline bestimmt werden sollten, wurde auch darauf geachtet, ob auf dem Dünnschicht-Chromatogramm zusätzliche Flecken auftraten, die von Metaboliten herrührten.

6-Aminochinoline: Bei der Untersuchung von Exkrementen und Leber nach Injektion von 6-Aminochinolin wurden zwar unterhalb der unveränderten Substanzen weitere Flecken gefunden, die wie die Ausgangsverbindungen fluoreszierten, wegen der geringen Konzentration untersuchte man sie aber nicht weiter.

Auf der Höhe von B 505 erschien ein Fleck, der nur bei der Bestimmung

von sehr wenig B 505, in Exkrementen und Lebergewebe von Mäusen störte. Es konnte gezeigt werden, daß diese Störsubstanz im Futter enthalten war. Da das Fluoreszenzmaximum dieser Verbindung bei kürzeren Wellenlängen als das von B 505 lag, nahm ihre Fluoreszenzintensität bei größeren Wellenlängen schneller ab als die von B 505. Deshalb konnte die Fluoreszenz von B 505 in diesem Fall bei etwa 560 nm praktisch ungestört gemessen werden.

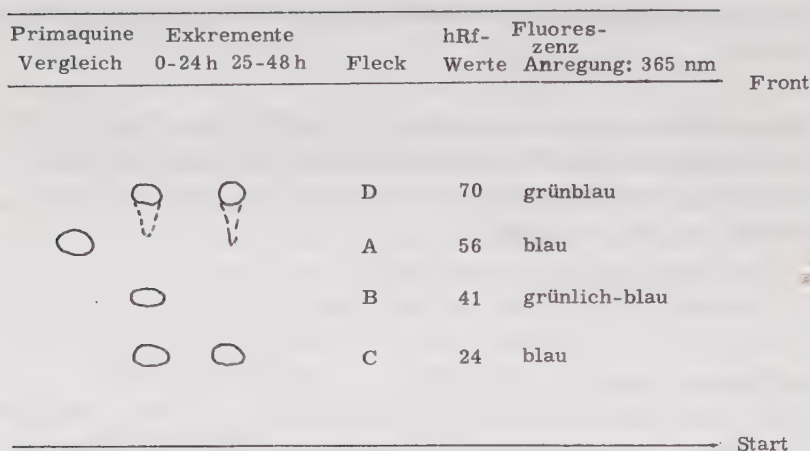
Als eine Ursache weiterer Flecken, die bei Exkrementen gelegentlich und mit wechselnder Intensität auftraten, wurden die Farbstoffe eines Filzschreibers erkannt, der zur Kennzeichnung der Tiere statt Pikrinsäurelösung verwendet worden war.

Der Startpunkt zeigte immer eine grüne unspezifische Fluoreszenz, die selbst dann auftrat, wenn die salzsaure Auftragslösung nur durch Verdünnung der Stammlösung hergestellt worden war. Wahrscheinlich wurde diese Fluoreszenz durch den Zusatz von Ascorbinsäure zur Salzsäure verursacht. Metaboliten, die möglicherweise am Startpunkt sitzenblieben, konnten also nicht erfaßt werden.

Primaquine: In den Exkrementen von Mäusen wurde kein unverändertes Primaquine gefunden ($< 0,5$ % der Dosis). Es traten aber 3 andere Flecken auf, siehe Abb. 7.

Der Fleck B erschien nur am 1. Tag nach der Applikation und kann deshalb als Abbauprodukt von Primaquine betrachtet werden. Da er bei der Auswertung keinen symmetrischen Peak ergab, ist zu vermuten, daß es sich um zwei verschiedene Substanzen handelt. Beide zusammen, berechnet als Primaquine, ergaben etwa 6 % der Dosis. Die Fluoreszenzintensität von Fleck C blieb am 2. Tag gleich stark. Die Substanz, die Fleck D hervorrief, ließ sich mit Salzsäure praktisch nicht aus der organischen Phase extrahieren und gelangte nur in geringer Menge auf das Chromatogramm.

Abbildung 7 Dünnschichtchromatogramm von Extrakten
aus Maus-Exkrementen nach Primaquinegabe.



Fließmittel: siehe Tab. 5

Nachbehandlung: siehe Kapitel 3.2.2.

Beim Liegenlassen der Platte an der Luft färbten sich der Startpunkt und Fleck D rot an. Es wurde nicht weiter untersucht, ob die Flecken C und D mit der Primaquinegabe in Zusammenhang stehen.

Resochin: Bei der üblichen Bestimmung von Resochin in Exkrementen und Lebern von Mäusen und Vögeln wurde in Abhängigkeit von der Resochin-gabe ein stahlblau wie Resochin fluoreszierender Fleck gefunden, der sich

nur wenig vom Start abhob. Zur Untersuchung dieses Metaboliten wurden die salzsauren Extrakte der Lebern von Mäusen und Kanarien, die bei der Bestimmung von Resochin übrigblieben, gesammelt, vereinigt und nach Zugabe von Natronlauge bei pH 14 mit etwa 15 ml Benzol extrahiert. Die Benzol-Phase trennte man ab und schüttelte sie zur Reinigung noch zweimal

Abbildung 8 Dünnschichtchromatogramm von Extrakten
aus Maus- und Kanarienvogellebern, 2 Stdn.
nach Resochingabe.

Resochin Vergleich	Leber Extrakte	Fleck	hRf- Wert	Fluoreszenz Anregung 313 nm	
		1	93	keine	Front
		2	68	keine	
		I	59	blau	
		3	48	keine	
		II	38	blau	
		III	29	grün	
		IV	13	blau	
					Start

Fließmittel I : Cyclohexan/Benzol/Methanol/Diäthylamin
(30 : 20 : 10 : 10)

mit 20 ml 0,1 n NaOH . Je 2 ml von dieser organischen Lösung schüttelte man mit Hilfe einer Ampulle in 20 μ l 20 %ige Salzsäure und untersuchte den angereicherten salzsauren Extrakt dünnschichtchromatographisch.

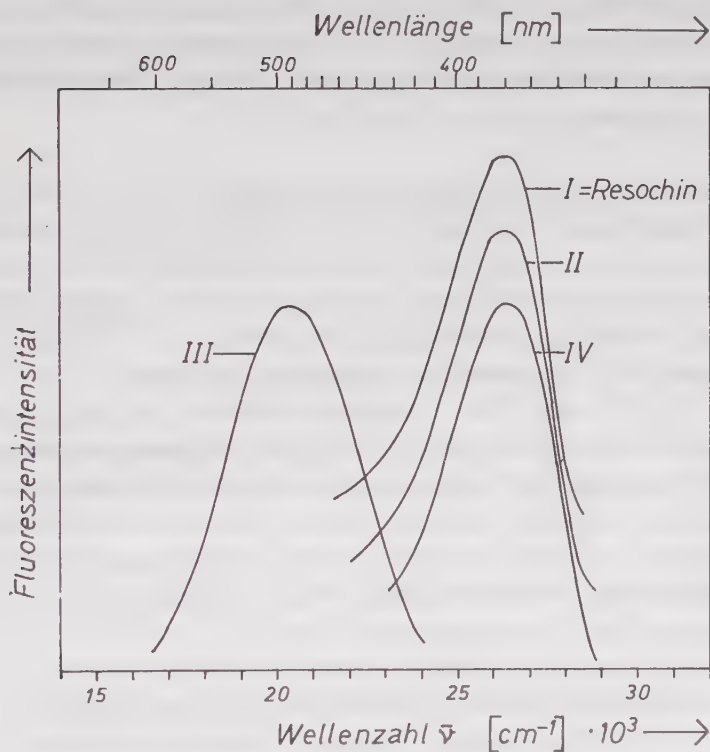
Auf dem entwickelten Chromatogramm zeigte sich eine Reihe von Flecken, siehe Abb. 8 .

Die Flecken I bis IV fluoreszierten bei Anregung mit UV-Licht, 313 nm, in den angegebenen Farben, während die Flecke 1 bis 3 erst an der Luft nach einiger Zeit mit gelber Farbe sichtbar wurden. Die Fluoreszenzintensitäten der Flecken I, II und IV verhielten sich etwa wie 25 : 5 : 1 zueinander. Deshalb war Fleck IV bei der üblichen Aufarbeitung nicht entdeckt worden. Fleck III zeigte bei dieser Anregung nur ein schwaches Leuchten, so daß er ebenfalls vorher nicht zu erkennen gewesen war.

Um von den Flecken I bis IV direkt auf der Platte ein Fluoreszenzspektrum aufnehmen zu können, durfte sich ihre Fluoreszenz während der Messung nicht ändern. An der Luft nahm sie aber schnell ab. Deshalb wurde der Extrakt erneut in Fließmittel I unter Luftausschluß chromatographiert und die Schicht im Stickstoffstrom getrocknet. Da keine UV-durchlässige Glasplatte zum Abdecken der Schicht vorhanden war, behalf man sich mit einer Cellophanhaut, die am Plattenrand mit Klebestreifen luftdicht befestigt wurde. In Vorversuchen war die gute Durchlässigkeit des Cellophans für UV-Licht bis etwa 310 nm festgestellt worden. Nun blieb die Fluoreszenzintensität der Flecken lange genug konstant.

Die Fluoreszenzspektren bestimmte man auf folgende Weise. Der größte Teil des Substanzfleckes wurde unter den Meßspalt gebracht und mit der Hg-Lampe bei 313 bzw. 365 nm angeregt. Während der Schreiber mit gleichbleibender Geschwindigkeit lief, verstellte man nach jeweils gleichen Zeitintervallen von etwa 3 Sekunden den Wellenlängenvortrieb ruckartig

Abbildung 9 Direkt auf einer Dünnschichtplatte gemessene,
unkorrigierte Fluoreszenzspektren der Flecke
I bis IV von Abb. 8.



Anregung 313 nm : I, II, IV

Anregung 365 nm : III

Monochromatorspalt : 0,4

Verstärkung: variabel

um jeweils $0,25 \cdot 10^{-3}$ Wellenzahlen. Man erhielt so ein stufenförmig aufgezeichnetes Spektrum. Anschließend wurde ein substanzfreier Ausschnitt der Schicht unter den Meßspalt geschoben und das Spektrum des Plattenuntergrundes in gleicher Weise so auf demselben Papier registriert, daß beide Spektren im gleichen Koordinatensystem zu liegen kamen. Die Differenzen der Fluoreszenzintensitäten wurden für jeden Meßpunkt in mm ausgemessen, in Prozent des maximalen Ausschlages umgerechnet und gegen die Wellenzahl aufgetragen, siehe Abb. 9.

Die Spektren der Flecke I, II und IV waren praktisch identisch. Die geringen Abweichungen lassen sich durch die unterschiedlichen Substanzmengen pro Fleck erklären, da von 50 ng Resochin ein Spektrum wie von Fleck IV erhalten wurde. Die Substanzen der Flecke II und IV enthielten demnach den unveränderten Chinolinring des Resochins = I⁶⁶⁾ Sie konnten sich also nur in der Seitenkette von Resochin unterscheiden.

Zur weiteren Charakterisierung der fluoreszierenden Substanzen kratzte man die Flecke aus, füllte das Kieselgel in sehr schmale Glassäulen und eluierte die Verbindungen mit wenigen Tropfen einer Mischung von Methanol mit Diäthylamin (3 + 1). Nach dem Abdunsten des Lösungsmittels wurde der Rückstand jeweils in 50 bis 100 µl Salzsäure aufgenommen und erneut auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen.

Das Chromatogramm entwickelte man mit dem Fließmittel Ammoniumhydroxyd (20 %) / Isopropanol / Essigester (im Vol.-Verhältnis 12 : 30 : 158), das von McChesney⁶⁴⁾ zur Trennung von Resochin und seinen Metaboliten benutzt wurde. Folgende hRf-Werte wurden gefunden: Fleck I = Resochin = 45, Fleck II = 16, Fleck III = 6, Fleck IV = 13. McChesney gibt als hRf-Wert für Resochin 44, für Monodesäthyl-Resochin 17 an, der mit Fleck II übereinstimmt. Ein Versuch, das Massenspektrum der Verbindung von Fleck II aufzunehmen,

scheiterte an der geringen Substanzmenge. Auf Grund der ausgezeichneten Übereinstimmung der hRf-Werte, der Fluoreszenzspektren und der relativen Mengenverhältnisse (Verhältnis Resochin zu Monodesäthyl-Resochin beim Menschen; Mittelwerte: 60 : 37⁶³⁾ bzw. 70 : 23⁶⁶⁾) kann man Fleck II mit großer Sicherheit dem Monodesäthyl-Resochin zuordnen. Die Substanzen der Flecke III und IV ließen sich auf diese Weise nicht identifizieren. Die Flecken 1 bis 3 wurden nicht weiter untersucht.

4. 2. 2. Gehalt des biologischen Materials an unveränderten Aminochinolin

4. 2. 2. 1. Blut

Die erste Blutprobe wurde eine halbe bis eine Stunde nach Injektion der Substanz gewonnen. Von diesem Zeitpunkt an wurde die Abnahme des Blutspiegels so lange verfolgt, bis entweder keine Substanz mehr nachweisbar war oder die erhaltenen Werte zur Bestimmung der biologischen Halbwertszeit ausreichten.

Zur Darstellung und Auswertung der Versuchsergebnisse richtete man sich nach den von D o s t¹⁸⁾ angegebenen Verfahren. Die erhaltenen Analysergebnisse rechnete man in Konzentrationen, Substanzmenge pro ml Blut = Blutspiegel, um und zeichnete diese Werte in ein halblogarithmisches Koordinatensystem ein, wobei auf der linear eingeteilten Abszisse die Zeit und auf der logarithmisch geteilten Ordinate der Blutspiegel aufgetragen wurde. Das Absinken des Blutspiegels der meisten körperfremden Stoffe erfolgt nach D o s t entsprechend einer einfachen Exponentialfunktion. Danach war zunächst zu überprüfen, ob die Blutspiegel der 6-Aminochinoline der gleichen Gesetzmäßigkeit folgten, sobald sich nach der Injektion der Substanz ein Diffusionsgleichgewicht zwischen Blut und

Gewebe eingestellt hatte. Wie man den Blutspiegelkurven entnehmen kann, lagen schon die ersten Werte im linearen Bereich, d. h. das Verteilungsgleichgewicht war bereits innerhalb der ersten halben Stunde erreicht, unabhängig davon, ob die Substanz i. v. (Kanarienvogel) oder i. p. (Maus) injiziert worden war.

Um aus den streuenden Einzelmessungen zu Blutspiegelkurven zu gelangen, wurden diese als Regressionsgeraden durch Korrelationsrechnung ermittelt ^{18, 87)} nach den Formeln:

$$\hat{y} = R \cdot x + A$$

$$R = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$A = \frac{y - R \cdot x}{n}$$

n = Zahl der Einzelmessungen;
Einzelwert in ng / ml Blut

y = log des Einzelwertes

x = Zeit nach der Applikation
in Minuten

Die berechneten Geraden lassen sich auch in folgender allgemeiner Form schreiben, um Eliminationskonstante k_2 und fiktiven Blutspiegelwert a zur Zeit $x = 0$ zu berechnen:

$$\log y = -k_2 \cdot \log e \cdot t + \log a$$

- y = Blutspiegel
t = Zeit nach Applikation der Dosis
a = (fiktiver) Blutspiegelwert zur Zeit $t = 0$, welcher demjenigen Blutspiegel entspricht, der sich ergeben würde, wenn das Diffusionsgleichgewicht des injizierten Stoffes zwischen Blut und Gewebsflüssigkeit schon unmittelbar nach beendeter Injektion tatsächlich bestünde.
 k_2 = Eliminationskonstante

Nach Delogarithmierung erhält man die Gleichung in der einfachen Schreibweise

$$y = a \cdot e^{-k_2 t}$$

Aus der Eliminationskonstanten k_2 läßt sich die biologische Halbwertszeit $t_{1/2}$ nach der Formel

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2}$$

ermitteln. Die Halbwertszeit stellt ein anschauliches Maß für die Eliminationsgeschwindigkeit dar.

In den Abb. 10, 11 und 12 sind jeweils die einzelnen Meßpunkte und die daraus errechneten Regressionsgeraden eingezeichnet.

Mit Hilfe des Wertes a und der Dosierung D in μg Substanz pro g Tier läßt sich als weitere wichtige pharmakokinetische Rechengröße das Verteilungsvolumen V ermitteln. Darunter ist dasjenige Volumen zu verstehen, auf das die applizierte Substanzmenge zu verdünnen wäre, um den fiktiven Blutspiegelwert zur Zeit $t = 0$ zu erhalten. Das Verteilungsvolumen V errechnet sich aus folgender Formel:

$$V \left[\text{ml} \right] = \frac{D \left[\mu\text{g} \right]}{a \left[\mu\text{g} / \text{ml} \right]}$$

Abb. 10

Blutspiegel von Resochin und Verbindung II

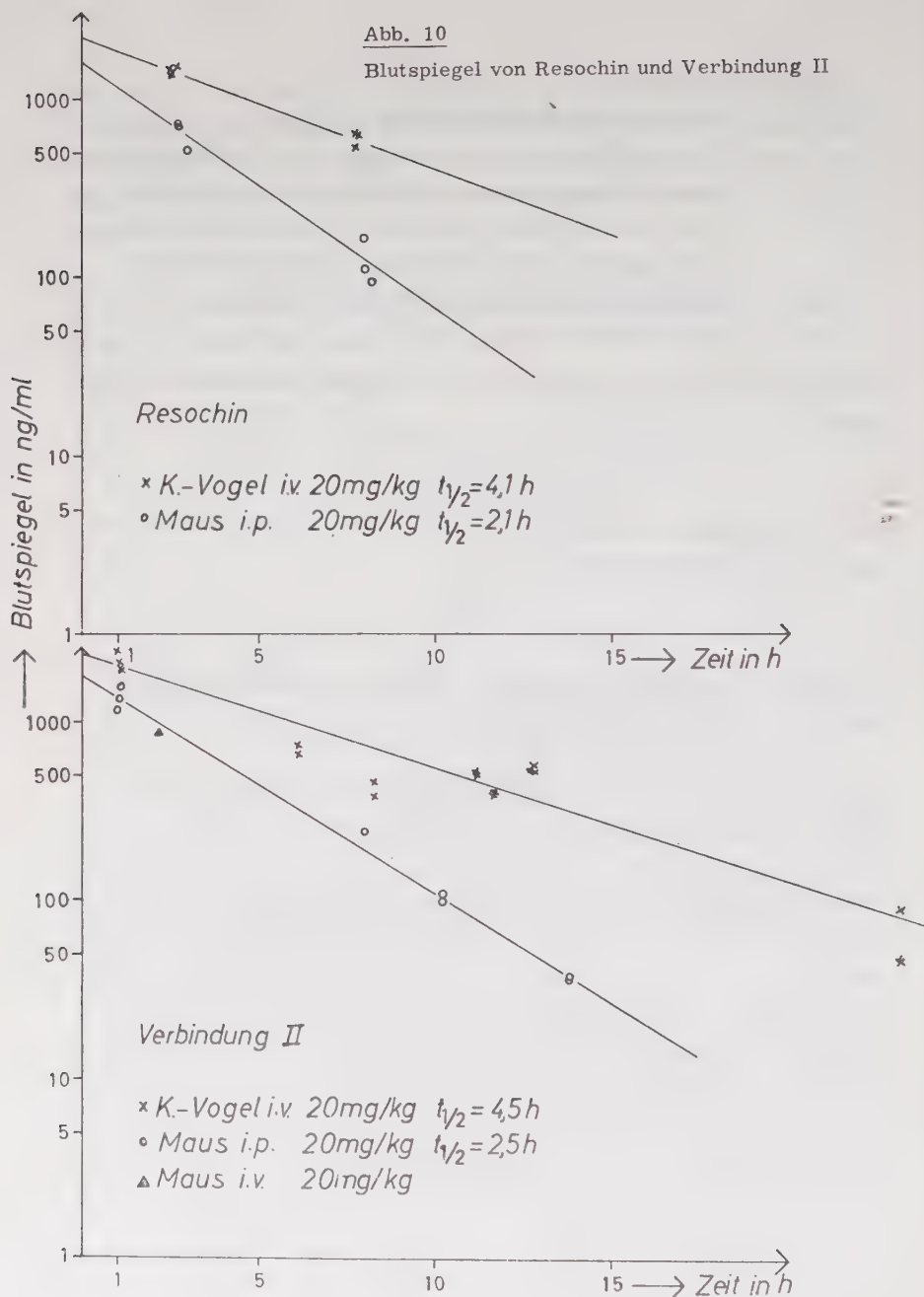


Abb. 11 Blutspiegel von Verbindung III und B 505

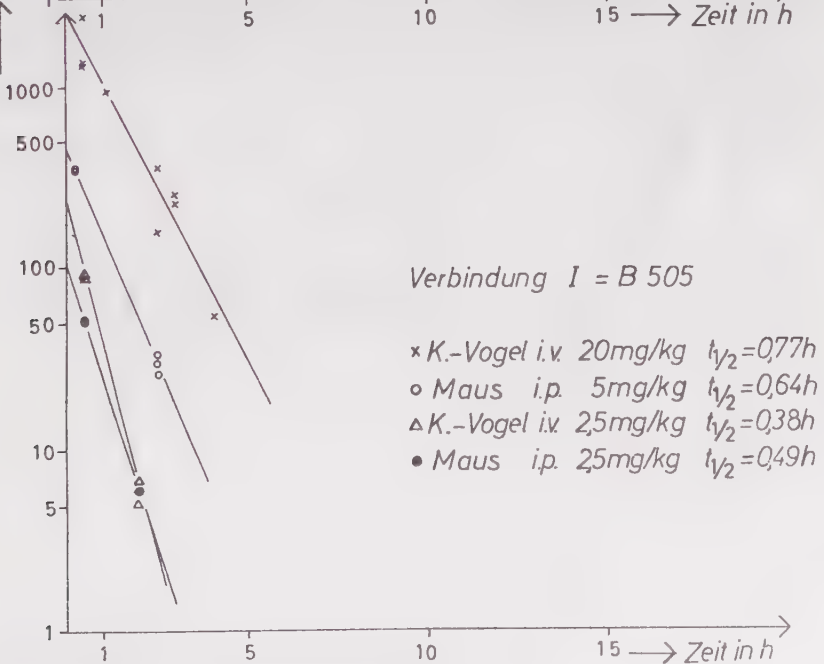
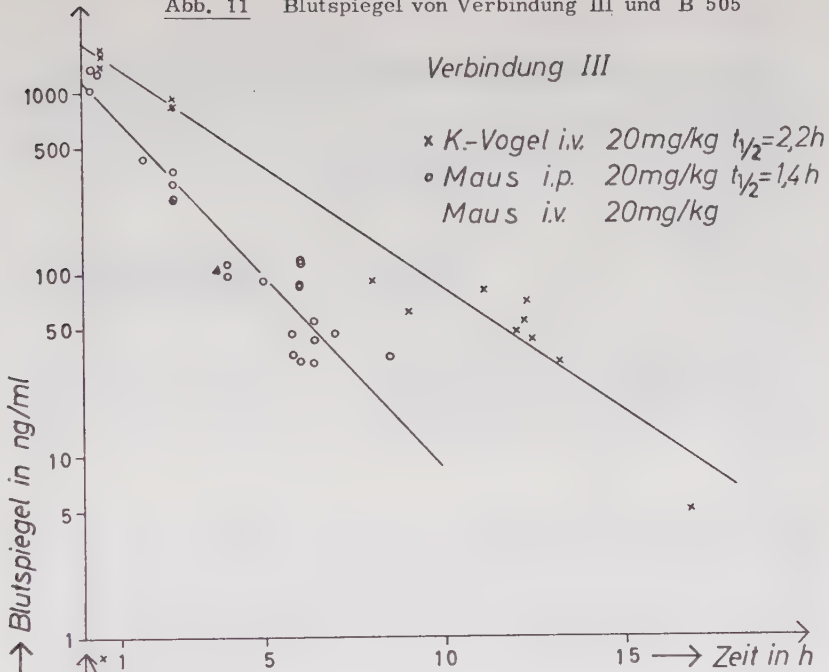
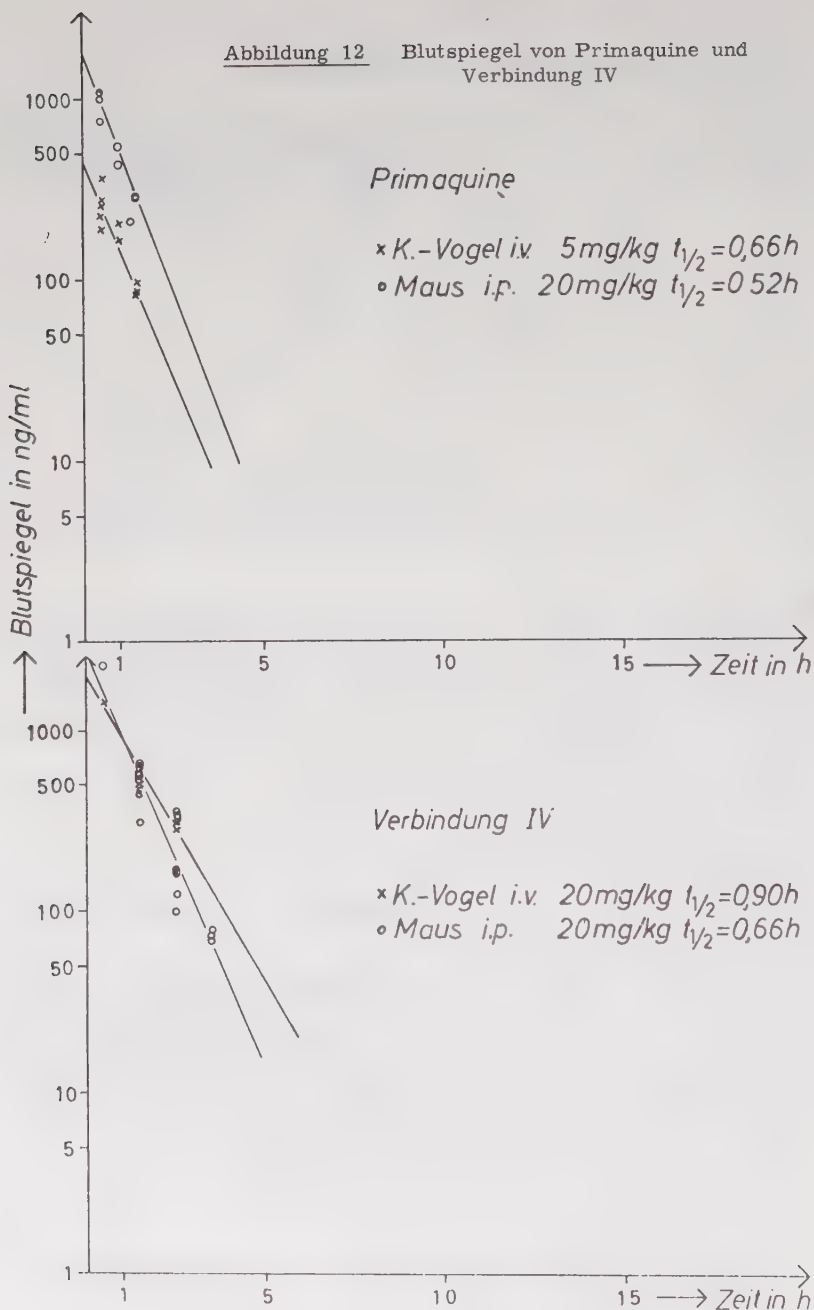


Abbildung 12 Blutspiegel von Primaquine und
Verbindung IV



Es gibt Aufschluß über das Verteilungsverhältnis der Substanz zwischen Blut und übrigen Organismus. In Tab. 12 sind die gefundenen Werte für a , V , k_2 und $t_{1/2}$ zusammengestellt, siehe Kap. 4.3.1.1.

4.2.2.2. Exkrementa

Die Vorlagen zum Auffangen der Exkrementa wechselte man nur jeweils in Intervallen von 24 Stunden aus, um physiologische Schwankungen weitgehend auszugleichen. Die Ausscheidung der Substanzen verfolgte man über 3 Tage.

Bei der Aufarbeitung nach Resochin- und Primaquine-Gaben wurden Metaboliten (Kap. 4.2.1.) gefunden. Da die Metaboliten von Resochin die gleichen Fluoreszenzspektren wie Resochin zeigten, errechnete man ihre Menge als unverändertes Resochin. Die entsprechend Kap. 5.10.4. berechneten Analysenwerte wurden in % der applizierten Substanzmenge ausgedrückt. Die so berechneten Einzelwerte, ihre Mittelwerte und die innerhalb von 3 Tagen unverändert ausgeschiedenen Anteile der Dosis sind in den Tabellen 9a, 9b und 10 zusammengefaßt.

Tabelle 9a

In Exkrementen in Zeitintervallen von je 24 h nach der Applikation gefundene Substanzmengen in % der Einzeldosis von 2,5 mg/kg (Maus i.p., Kanarienvogel i.v.)

Dosisanteile in %, Einzelwerte

Substanz	Maus			Kanarienvogel		
	0-24 h	25-48 h	49-72 h	0-24 h	25-48 h	49-72 h
Resochin	41	3,0	0,5	52	7,2	2,5
	42	3,2	0,6	56	7,4	2,8
	44	3,3	0,7	57	9,5	
	<u>42</u>	<u>3,2</u>	<u>0,5</u>	<u>55</u>	<u>8</u>	<u>2,7</u>
Mittelwert	42	3,2	0,5	55	8	2,7

II	18	0,3		44	5,1	1,7
	24	0,4		45	5,4	2,5
	25	0,7		47	6,5	
	32					
Mittelwert	25	0,5		45	6	2,1

III	3,9	0,44		16	0,18	
	4,2	0,65		16		
	4,9			22		
	5,4			22		
	8,6			26		
Mittelwert	5,4	0,6		20	0,2	

Fortsetzung Tabelle 9a : Seite 69

Forts. Tabelle 9a von Seite 68 :

Substanz	Maus			Kanarienvogel		
	0-24 h	25-48 h	49-72 h	0-24 h	25-48 h	49-72 h
B 505	6,7	< 0,2		13	< 0,2	
	7,5			32		
	8,8			35		
	9			37		
	11			39		
	12			40		
	12			42		
	13			43		
	13			44		
	13			48		
	15			56		
Mittelwert	11	< 0,2		39	< 0,2	
Primaquine	≤ 0,5			nicht untersucht		
Prim. - Metaboliten x)	6	0				
Resochin- Metabolit II x)	19	4,4	nicht	4,6	1,8	nicht
	22	4,9	aus-	5,9	1,9	aus-
	23	5,3	wert-	6,5	2,3	wert-
			bar			bar
Mittelwert	21	4,9		6	2,0	

x) siehe Abschnitt 4.2.1.

Tabelle 9b

Mittelwerte von in Exkrementen in Zeitintervallen von
je 24 h nach der Applikation gefundenen Substanzmengen
in % der Einzeldosis von 2,5 mg/kg
(Maus i.p., Kanarienvogel i.v.).

Substanz	Maus			Kanarienvogel		
	0-24 h	25-48 h	49-72 h	0-24 h	25-48 h	49-72 h
Resochin	42	3,2	0,5	55	8	2,7
Resochin- Metabolit II +)	21	4,9	? ++)	6	2,0	? ++)
Resochin+ Metabolit II +)	63	8,1	> 0,5	61	10	3
II	25	0,5	-	45	6	2,1
III	5,4	0,6	-	20	0,2	-
B 505	11	< 0,2	-	39	< 0,2	-
Primaquine	≤ 0,5	-	-	-	-	-
Primaquine- Metabolit +)	6	0	-	-	-	-

+) siehe Abschnitt 4.2.1.

++) war nicht auswertbar

Tabelle 10

Innerhalb von 3 Tagen nach Applikation mit den Exkrementen ausgeschiedene Dosisanteile und ihr relatives Verhältnis zwischen Maus und Kanarienvogel.

Substanz	ausgeschiedener Anteil in %		relatives Verhältnis	
	Maus	K. - Vogel	Maus	: K. - Vogel
Resochin	46	66	1,0	: 1,4
Resochin-Metabolit II *)	> 26 ^x	> 8 ^x	3,3	: 1,0
Resochin + Metabolit	72	74	1,0	: 1,0
II	26	53	1,0	: 2,0
III	6	20	1,0	: 3,3
B 505	11	39	1,0	: 3,5
Primaquine	(0)	-	-	-

x = nur von 0-48 Stdn. bestimmt

*) siehe Abschnitt 4.2.1.

4. 2. 2. 3. Lebergewebe

Da B 505 im Lebergewebe nur bis zu 2 Stunden nach der Injektion in noch meßbaren Mengen vorhanden war, entfernte man die Leber bei allen Verbindungen nach 2 Stunden. Die Dosierungen wurden wie bei der Bestimmung der Blutspiegelwerte gewählt, um die Spiegel von Blut und Lebergewebe besser vergleichen zu können.

Bei der Aufarbeitung von Lebergewebe nach Resochingaben fand man den gleichen Metaboliten II wie in den Exkrementen. Er wurde zur quantitativen Bestimmung wie Resochin ausgewertet.

Die entsprechend Kap. 5, 10. 4. berechneten Gehalte der Analysenproben wurden in % der injizierten Dosis umgerechnet. Als weitere Angabe ermittelte man die Substanzmenge pro g Leber, den Leberspiegel. Dazu benötigte man das mittlere Lebergewicht, das für die Maus aus 43 Einzelwerten zu 1,13 g und für den Kanarienvogel aus 62 Einzelwerten zu 0,70 g bestimmt wurde. Das mittlere Gewicht der in den Versuchen eingesetzten Tiere ergab sich für eine Maus (50 Tiere) zu 21,9 g, das mittlere Gewicht eines Kanarienvogels (61 Tiere) zu 20,2 g. Die Berechnung des Leberspiegels wurde nach folgender Formel ausgeführt:

$$\text{Lebersp.} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right] = \frac{\text{Tiergew.}}{\text{Lebergew.}} \times \frac{\% \text{ der Dosis i. d. ges. Leber}}{100} \times \text{Dosier.} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right]$$

Die erhaltenen Werte sind in Tab. 11 zusammengefaßt.

Tabelle 11

In Lebergewebe 2 Stdn. nach Applikation gefundene Substanzmengen

Verbindung (Dosis in mg/kg)	Resochin (20)		Resochin- ^{**} Metabolit II (20)		Resochin + Metabolit (20)		II [*] (20)		III (20)		B 505 (25)	
	Maus	K.-Vogel	Maus	K.-Vogel	Maus	K.-Vogel	Maus	K.-Vogel	Maus	K.-Vogel	Maus	K.-Vogel
% der Dosis in der ge- samten Leber Einzelwerte	8,2	9,3	3,6	0,1			3,1	4,5	1,1	3,8	0,065	0,15
	8,8	11,7	4,0	0,8			3,2	5,6	1,3	4,5	0,081	0,17
	9,5	15,9	4,8	1,0			3,5	6,7	1,4	4,8	0,082	0,18
	12,7	17,1	5,3	1,1			5,9	9,5	1,5	7,3	0,084	0,21
Mittelwerte	9,8	13,5	4,4	0,8		14,3	3,9	8,2	1,6	5,1	0,10	0,18
Leberspiegel in µg / g	38	78	17	4,6	55	83	15	47	6,2	30	0,044	0,13
Lebersp. Vogel Lebersp. Maus	1,0 : 2,0	2,0	3,7 : 1,0	1,0	1,0 : 1,5	1,5	1,0 : 3,1	3,1	1,0 : 4,8	4,8	1,0 : 3,0	3,0

* mit Ausbeute von Verbindung III berechnet, siehe Kap. 3.4.2., Tab. 8

** siehe Kap. 4.2.1.

Bei höherer Dosierung steigen bei B 505 die Halbwertszeiten an. Bei Primaquine liegen die Werte nur für verschiedene Dosierungen vor. Wenn beim Kanarienvogel eine höhere Dosierung vorgelegen hätte, wäre wahrscheinlich die Halbwertszeit erheblich über die bei der Maus zu liegen gekommen.

4. 3. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ⁺⁾

4. 3. 1. Gehalt des biologischen Materials an unveränderten Aminochinolin

4. 3. 1. 1. Blut

In Abb. 13 ist der relative Verlauf der für Maus und Kanarienvogel erhaltene Blutspiegelkurven wiedergegeben.

Tab. 12 enthält die daraus berechneten pharmakokinetischen Daten.

Unterschiede zwischen Maus und Kanarienvogel: Da die Werte bei jeweils für beide Tierarten gleicher Dosierung bestimmt wurden - mit Ausnahme der Primaquinewerte - sind sie untereinander ohne Einschränkung vergleichbar.

Die Halbwertszeiten sind beim Kanarienvogel in der Regel um den Faktor 1,5 bis 2 größer als bei der Maus.

Eine Ausnahme bildet das B 505, das bei einer gleichen, niedrigen Dosierung von jeweils 2,5 mg/kg von beiden Tierarten praktisch gleich schnell aus dem Blut eliminiert wird. Ganz ähnlich liegen die Halbwertszeiten auch bei Primaquine.

⁺⁾ Berechnung bzw. Einzelergebnisse siehe Kap. 4. 2. 2.

Abbildung 13

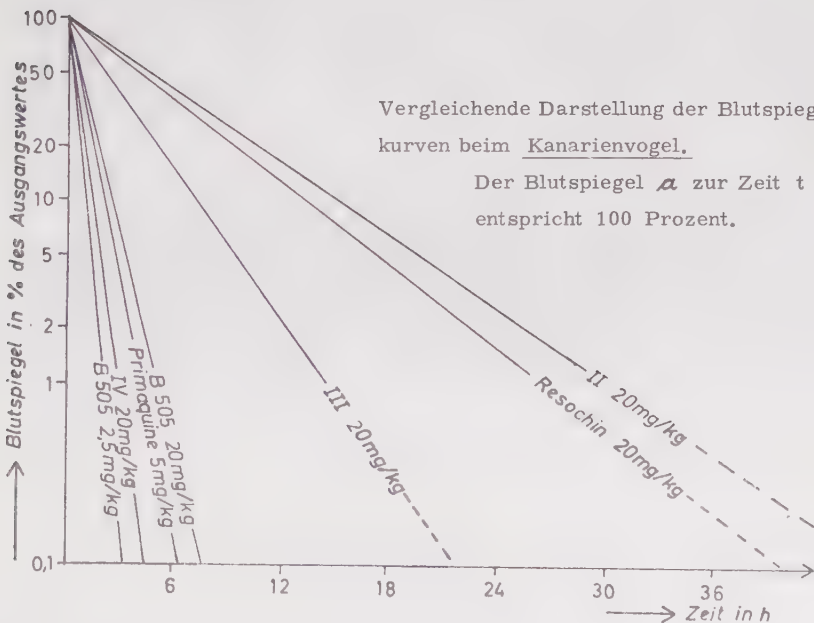
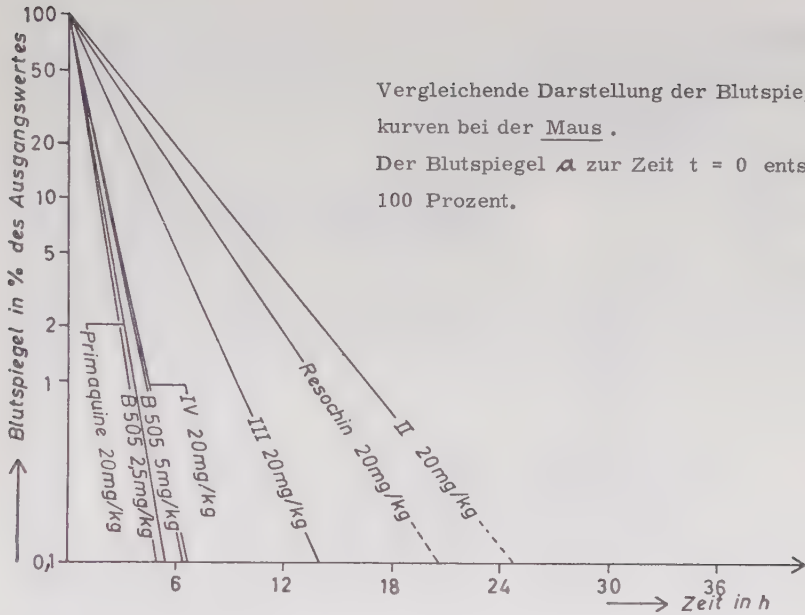


Tabelle 12

Aus den Blutspiegelkurven nach D o s t ¹⁸⁾ berechnete
pharmakokinetische Werte.
Einzelheiten siehe Kap. 4. 2. 2. 1.

Verbindung	Tier	Dosis [mg/kg]	a [µg/ml]	V [ml]	k ₂ [h ⁻¹]	t _{1/2} [h]
Resochin	Maus	20	1,7	12	0,33	2,1
	K. -Vogel	20	2,2	9	0,17	4,1
II	Maus	20	1,9	11	0,28	2,5
	K. -Vogel	20	2,5	7,8	0,16	4,5
III	Maus	20	1,1	18	0,49	1,4
	K. -Vogel	20	1,8	11	0,31	2,2
B 505	Maus	2,5	0,10	24	1,4	0,49
	K. -Vogel	2,5	0,23	11	1,8	0,38
	Maus	5,0	0,45	11	1,1	0,64
	K. -Vogel	20	2,6	7,8	0,9	0,77
Primaquine	Maus	20	1,8	11	1,3	0,52
	K. -Vogel	5	0,45	11	1,0	0,66
IV	Maus	20	2,6	7,7	1,0	0,66
	K. -Vogel	20	1,9	11	0,8	0,90

a = extrapolierter Blutspiegelwert zur Zeit t = 0

V = Verteilungsvolumen

k₂ = Eliminationskonstante

t_{1/2} = biologische Halbwertszeit

Das Verteilungsvolumen ist in der Regel bei der Maus größer als beim Kanarienvogel. Bei Verbindung IV ist es umgekehrt. Da bei B 505 das Verteilungsvolumen mit steigender Dosis kleiner wird, kann man vermuten, daß sich dieser Effekt auch bei Primaquine bemerkbar machen würde. Unter dieser Annahme ist das Verteilungsvolumen von Primaquine bei der Maus auch größer als beim Kanarienvogel.

Mit Sicherheit läßt sich also feststellen, daß die Verbindungen II, III und Resochin aus dem Blut von Kanarien wesentlich langsamer eliminiert werden als bei Mäusen, während für B 505 praktisch kein Unterschied feststellbar ist.

Unterschiedliches Verhalten der Aminochinoline bei einer Tierart:

Die Halbwertszeiten der 6-Aminochinoline unterscheiden sich in erheblichem Maße. Sowohl bei Kanarienvögeln wie Mäusen nimmt die Halbwertszeit durch Einführung einer 4-Methylgruppe in B 505, bei III, stark zu. Dieser Effekt wird durch eine Methoxy-Gruppe in 4-Stellung, bei II, noch weit übertroffen, so daß Verbindung II sogar noch etwas länger im Blut verweilt als Resochin.

Vergleicht man die Halbwertszeiten von B 505 und seinem analogen Derivat IV miteinander, so wird Verbindung IV mit der primären Aminogruppe in der Seitenkette schneller aus dem Blut von Kanarienvögeln eliminiert als B 505 mit der tertiären Aminogruppe. Die für Verbindung IV an Mäusen gefundenen Werte lassen unter Berücksichtigung der Dosierung die gleiche Tendenz erkennen.

Das Verteilungsvolumen zeigt für alle Verbindungen in vergleichbarer Dosierung Werte, die um die Zahl 10 schwanken. Das bedeutet, daß die Aminochinoline kurz nach der Applikation gegenüber dem Blut im übrigen Organismus stark angereichert sind.

4.3.1.2. Exkremente

Alle Verbindungen wurden mit 2,5 mg/kg einmal appliziert (i.p. bzw. i.v.). In Abb. 14 sind die innerhalb von drei Tagen mit Kot und Urin ausgeschiedenen Substanzmengen in Prozent der Dosis graphisch dargestellt, wobei die Exkremente in Intervallen von jeweils 24 Std. analysiert wurden.

Bis zum 3. Tag war die Ausscheidung der Ausgangsverbindungen abgeschlossen. Nur Resochin und Verbindung II waren noch in sehr geringer Menge in Vogelexkrementen zu erwarten.

Unterschiede zwischen Maus und Kanarienvogel: Die Menge an unverändert ausgeschiedener Substanz ist beim Kanarienvogel für alle Verbindungen erheblich größer als bei der Maus. Die Ausscheidung der Aminochinoline ist beim Kanarienvogel später abgeschlossen als bei der Maus.

Rechnet man Resochin und Monodesäthyl-Resochin, seinen mengenmäßig einzigen ins Gewicht fallenden Metaboliten II, zusammen, scheiden beide Tierarten innerhalb von drei Tagen etwa die gleiche Menge, 70-75 % der Dosis, aus. Das Verhältnis zwischen unverändertem Resochin und seinem wichtigsten Metaboliten ist aber sehr unterschiedlich. Es beträgt für die Maus etwa 2 : 1 und für den Kanarienvogel etwa 8 : 1. Die Maus metabolisiert Resochin durch Abspaltung einer Äthylgruppe in der Seitenkette also wesentlich intensiver als der Kanarienvogel.

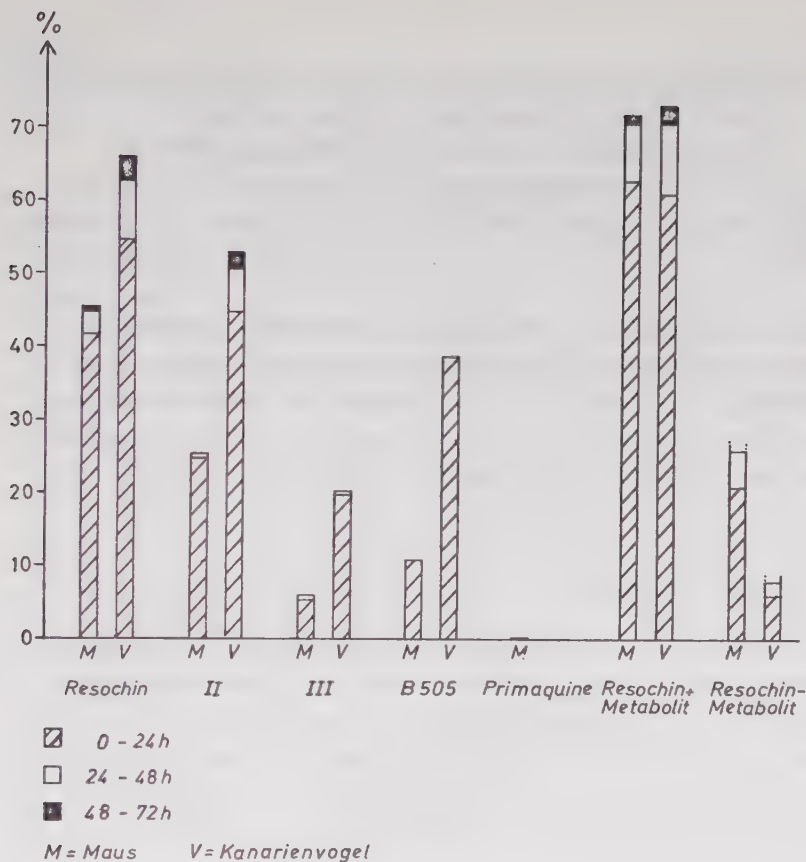


Abbildung 14

In Exkrementen innerhalb von 3 Tagen gefundene Substanzmengen in % der Dosis (2,5 mg/kg, Maus i. p., Vogel i. v.).

Einzelheiten siehe Kapitel 4.2.2.2.

Unterschiedliches Verhalten der Aminoquinoline bei einer Tierart:

Da in den Exkrementen von Mäusen von Primaquine praktisch kein (< 0,5 %) Ausgangsprodukt und von B 505 nur etwa 10 % wiedergefunden wurden, sah man von einer weiteren Untersuchung von Verbindung IV ab.

Bei den anderen Aminoquinolinen steigt der Anteil an unveränderter ausgeschiedener Substanz sowohl beim Kanarienvogel wie bei der Maus in der Reihenfolge III < B 505 < II < Resochin an. Es ist bemerkenswert, daß B 505 in dieser Reihe genau zwischen den in 4-Stellung substituierten Verbindungen III und II steht.

4.3.1.3. Lebergewebe

In Tab. 13 sind u. a. Substanzkonzentrationen, die nach 2 Stdn. in der Leber bestimmt wurden, aufgeführt. In der Kanarienvogelleber ist die Konzentration der Verbindungen nach 2 Stdn. etwa doppelt bis fünfmal höher als in der Mäuseleber. Der Leberspiegel an Aminoquinolinen fällt bei beiden Tierarten in der Reihenfolge Resochin > II > III $\gg$ B 505 ab, wobei zwischen Verbindungen III und B 505 ein besonders großer Sprung zu beobachten ist.

(Tabelle 13 siehe Seite 81)

Tabelle 13

Gegenüberstellung von Blutspiegeln in $\mu\text{g} / \text{ml}$ und
Leberspiegeln in $\mu\text{g} / \text{g}$ 2 Stdn. nach Applikation.

Verbindung (Dosis in mg/kg)	Maus		K. -Vogel		Blut		Leber	
	Blut	Leber	Blut	Leber	Maus	Vogel	Maus	Vogel
Resochin (20)								
Spiegel	0,86	38	1,6	78				
Verhältnis	1 : 44		1 : 50		1 : 1,8		1 : 2,0	
II (20)								
Spiegel	1,1	15	1,9	47				
Verhältnis	1 : 14		1 : 25		1 : 1,7		1 : 3,1	
III (20)								
Spiegel	0,43	6,2	0,97	30				
Verhältnis	1 : 14		1 : 28		1 : 2,3		1 : 4,8	
B 505 (2,5)								
Spiegel	0,006	0,044	0,006	0,13				
Verhältnis	1 : 7		1 : 22		1 : 1,0		1 : 3,0	

4.4. Folgerungen aus den Ergebnissen der Tierversuche

4.4.1. Verhalten der 6-Aminochinoline in der Maus und im Kanarienvogel

Nach D o s t ¹⁸⁾ beeinflussen folgende Vorgänge und Umstände die Elimination eines Stoffes aus dem Blut:

1. Irreversible Bindung eines Stoffes außerhalb der Blutbahn,
2. Ausscheidungsvorgänge und
3. chemische Umwandlungen.

Verteilung und Bindung der 6-Aminochinoline im Organismus: Die Verteilung eines Stoffes im Organismus, also auch das Verteilungsvolumen, hängen einerseits von der Adsorption an Gewebe und andererseits von der Verteilung zwischen den wässrigen und lipoiden Phasen des Organismus ab ¹⁸⁾. Da für die untersuchten Aminochinoline jeweils etwa das gleiche Verteilungsvolumen gefunden wurde, kann man annehmen, daß der dominierende Einfluß auf die Verteilung von der stark basischen Seitenkette ausgeht, die beim pH-Wert des Blutes bei allen aufgeführten Aminochinolininen praktisch vollständig protoniert ist, siehe Tab. 14, während die Veränderungen am Chinolinring demgegenüber nur eine geringe Verschiebung bewirken.

Setzt man in Gedanken voraus, daß sich im Körper sofort nach Injektion ein Diffusionsgleichgewicht der Verbindungen einstellt, so liegt die durchschnittliche Substanzkonzentration im extravasalen Kompartiment, also auch in der Leber, zur Zeit $t = 0$ um denjenigen Faktor, den das Verteilungsvolumen angibt, über der Substanzkonzentration im Blut. Bei vollkommen reversibler Bindung der Substanzen im Gewebe und rascher Einstellung des Diffusionsgleichgewichts zwischen Gewebe und Blut müßte also dieses Verhältnis zwischen Blutspiegel und Leberspiegel nach beliebigen Zeitintervallen immer gleich bleiben. Vergleicht man die Konzentration in der Leber, die ein Teil des "Gewebes" ist, mit dem Blutspiegel zur Zeit $t = 2$ Stunden nach der Injektion, so wurde bei Mäusen für die 6-Aminochinoline tatsächlich etwa das gleiche Verhältnis gefunden. Das bedeutet, daß diese Verbindungen in der Leber und damit sehr wahrscheinlich auch im übrigen Gewebe der Mäuse nur schwach und reversibel gebunden sind, so daß sie praktisch nicht gespeichert werden. Bei Kanarienvögeln

wird eine gewisse Anreicherung der 6-Aminochinoline in der Leber gegenüber dem übrigen Gewebe beobachtet, vgl. Tab. 13.

Eine irreversible Bindung an Gewebe, wie sie für Atebrin beschrieben wurde ⁹⁷⁾, kann für die untersuchten 6-Aminochinoline ausgeschlossen werden.

Wie ein Vergleich zwischen Resochinkonzentrationen im Blut und Gewebe bzw. Leber zur Zeit $t = 0$ und 2 Stunden zeigt, wird Resochin in der Leber ⁹⁰⁾ auch bei diesen beiden Tierarten angereichert.

Einen weiteren Hinweis über die Speicherung der Verbindungen erhält man auf folgendem Wege. Verlängert man die Blutspiegelkurven geradlinig, bis die Konzentration im Blut nur noch etwa 0,1 % des Anfangsspiegels anzeigt (Abb. 13), so dürfte nach der entsprechenden Zeit praktisch keine Substanz mehr ausgeschieden werden. Je größer die weiterhin ausgeschiedene Substanzmenge ist und je länger die Ausscheidung darüber hinaus anhält (Abb. 14), umso stärker wird die Substanz gespeichert.

Auf Grund dieser Betrachtung wurde gefunden, daß die 6-Aminochinoline bei beiden Tierarten praktisch nicht gespeichert werden, da nicht mehr als 1 % der Dosis nach dem theoretischen Endpunkt der Ausscheidung gefunden wurde. Verbindung II scheint als Ausnahme beim Kanarienvogel geringfügig gespeichert zu werden. Für Resochin ließ sich eindeutig, besonders an der Maus, eine Speicherung feststellen.

Ausscheidung und Metabolismus der 6-Aminochinoline: In der Regel werden polare körperfremde Stoffe schneller ausgeschieden als unpolare ⁹⁾. Vergleicht man in Tab. 14 die bei physiologischem pH-Wert des Blutes am Chinolinstickstoff protonierten Anteile der Verbindungen II, III und B 505 miteinander, so könnte man annehmen, daß die Verbindung II

Tabelle 14

Basenstärken einiger Aminochinoline ^{74, 75)}.

Diäthylaminogruppe in der Seitenkette entspricht 1.

Chinolinringstickstoff entspricht 2.

Der bei pH 7,4 protonierte Anteil der Verbindungen wurde nach A l b e r t ¹⁾ berechnet.

Verbindung	pK _s		% Kation bei	
	1.	2.	1. pH 7,4	2.
Resochin	10,2	8,06	100	83
B 505	10,2	5,6	100	1,5
III	10,2	6,3	100	7,4
II	10,2	7,0	100	28,5

schneller ausgeschieden wird als B 505. Als Folge müßte der Blutspiegel schneller sinken und dementsprechend die Ausscheidung eher beendet sein. Es wurde aber genau der umgekehrte Effekt festgestellt (siehe Abb. 13 und 14).

Nach einer Beobachtung von N i c k e l ⁷⁵⁾ lassen sich die untersuchten 6-Aminochinoline unter sehr milden Bedingungen augenblicklich oxidieren, wenn der Chinolinringstickstoff nicht protoniert ist, dagegen sind die im Ring protonierten Verbindungen unter den gewählten Bedingungen stabil.

Diese Oxidationsempfindlichkeit des nicht im Ring protonierten Anteiles dürfte sich auch in vivo bemerkbar machen. Es wäre also denkbar, daß die erheblich voneinander abweichenden Halbwertszeiten zumindest teilweise

durch einen quantitativen Unterschied beim oxidativen Abbau hervorgerufen werden können. Daraus würde sich ergeben, daß der metabolisierte Anteil der Verbindungen in der Reihenfolge II, III und B 505 größer werden müßte, wenn gleiche Ausscheidungsverhältnisse angenommen werden. Der tatsächlich metabolisierte Anteil der Dosis läßt sich abschätzen. Da die Ausscheidung der unveränderten 6-Aminochinoline nach drei Tagen praktisch beendet war und eine irreversible Speicherung ausgeschlossen werden konnte, mußte der nicht wiedergefundene Anteil der Dosis metabolisiert worden sein. Ordnet man die 6-Aminochinoline nach ihren durch Differenzrechnung ermittelten metabolisierten Anteilen, so ergibt sich die Reihenfolge $II < B\ 505 < III$. Gegenüber der zuvor theoretisch angenommenen Reihenfolge tritt eine Vertauschung von B 505 mit Verbindung III auf. Diese Abweichung kann durch Unterschiede bei den Ausscheidungsvorgängen verursacht sein, z.B. bei der Rückresorption in der Niere, die möglicherweise mit dem Verteilungskoeffizienten der Verbindungen in Zusammenhang stehen.

Da beim Kanarienvogel der Zeitbedarf für die Ausscheidung von fast gleichen Substanzmengen z.B. für Verbindung II 24 Stunden und für B 505 etwa nur 4 Stunden beträgt, müssen neben den erwähnten Unterschieden in der Metabolisierungsrate auch erhebliche Unterschiede in der Ausscheidungsgeschwindigkeit der Verbindungen bestehen.

Beide Vorgänge, Metabolisierung und Ausscheidung, würden in gleicher Weise beeinflußt werden, wenn man eine unterschiedliche Bindung der Aminochinoline an Blutbestandteile annimmt. Praktisch alle Verbindungen werden mehr oder weniger adsorptiv reversibel an Plasmaproteine gebunden¹⁸⁾, wobei der adsorbierte gegenüber dem freien Anteil mit der Anzahl der bindungsfähigen Stellen im Molekül stark zunimmt¹⁾. Je geringer der nicht gebundene Anteil ist, desto weniger Substanz kann in der gleichen Zeit sowohl ausgeschieden als auch metabolisiert werden⁴³⁾. Deshalb wäre es

möglich, daß die als zweiwertige Kationen vorliegenden Anteile der 6-Aminochinoline stärker adsorbiert werden als die einwertigen, nur in der Seitenkette protonierten Anteile. Damit würden die verschiedenen Halbwertszeiten der Verbindungen II, III und B 505 ebenfalls erklärt werden können.

4.4.2. Unterschiede zwischen Maus und Kanarienvogel in der Elimination der 6-Aminochinoline

Die stoffwechselphysiologischen Eigenschaften von Maus und Kanarienvogel lassen sich gut miteinander vergleichen, da beide Tiere etwa gleich schwer sind, allerdings sind mir keine speziellen, vergleichenden Untersuchungen über ihren Metabolismus bekannt. Die Vögel haben eine höhere Temperatur als gleichgroße Säuger und einen wesentlich intensiveren Stoffwechsel^{12, 111)}. Füttert man beiden Tieren die gleiche Menge, 150 mg, Reis oder Hirse, so braucht die Maus zur Verdauung etwa 7 Stunden, während der Kanarienvogel schon nach 2 1/2 Stunden fertig ist⁷⁹⁾. Die Nahrung wird von Vögeln in hohem Maße ausgenutzt^{111, 12)}.

Deshalb konnte man vermuten, daß der Kanarienvogel auch körperfremde Substanzen, die nicht der Ernährung dienen, schneller umsetzt. Wie die Blutspiegel- und Ausscheidungsversuche zeigen, ist dies bei den untersuchten Aminochinolinen nicht der Fall. Die Maus metabolisiert die Aminochinoline wesentlich intensiver als der Kanarienvogel. Dieser Unterschied gilt sowohl für die Desalkylierung in der Seitenkette, wie sie für Resochin gezeigt wurde, wie für die vermutliche Oxidation am Chinolinkern, die sehr wahrscheinlich bei den 6-Aminochinolinen für den metabolischen Abbau verantwortlich ist^{74, 75)}.

Nimmt man an, daß der Abbau nur in der Leber erfolgt und sich bei Maus und Kanarienvogel nur in quantitativer Hinsicht unterscheidet, wie es für Resochin sicher gezeigt wurde und für die 6-Aminochinoline wahrscheinlich ist, könnte die unterschiedliche Abbaurate auf verschiedene Enzymaktivitäten oder unterschiedliche Enzymmengen zurückgeführt werden. Wahrscheinlich treffen beide Möglichkeiten gleichzeitig zu. Einerseits liegen nämlich die Substanzkonzentrationen in der Leber, bezogen auf den Blutspiegel, in der Reihe der 6-Aminochinoline bei der Maus halb so hoch wie beim Kanarienvogel, siehe Tab. 13, andererseits ist die Leber der Maus mit 1,1 g fast doppelt so groß wie die des Vogels mit 0,7 g.

In der Ausscheidungsgeschwindigkeit der unveränderten Substanzen scheinen keine so großen Unterschiede zwischen Maus und Kanarienvogel aufzutreten wie von Verbindung zu Verbindung an einem Tier.

4.4.3. Toxizität und Elimination von B 505 bei Maus und Kanarienvogel

Die Blutspiegel von B 505 verhalten sich bei beiden Tierarten wider Erwarten etwa gleich, so daß der Toxizitätsunterschied nicht direkt von der Konzentration an B 505 im Blut abhängen kann. Wenn kein Zusammenhang zwischen Blutspiegel und biologischer Aktivität der Verbindung gefunden wird, ist es nach Brodie¹⁰⁾ denkbar, daß entweder ein Metabolit die eigentliche Wirkung hervorruft oder daß die Verbindung irreversibel an den Rezeptor gebunden wird. Für die erste Möglichkeit spricht der große Unterschied in der Ausscheidung von unverändertem B 505, die bei der Maus etwa 10 % und beim Kanarienvogel etwa 40 % beträgt. Der restliche Anteil kann als metabolisiert betrachtet werden. Bei beiden Tierarten werden die Abbauprodukte in der gleichen Zeit gebildet, so daß bei der Maus ein höherer Metaboliten-Blutspiegel auftreten dürfte als beim Vogel. Diese Überlegung gilt auch für die Verbindungen III und IV, deren Metaboliten

hingegen wesentlich langsamer gebildet werden, so daß auch erheblich niedrigere Konzentrationen an Metaboliten zu erwarten sind als bei B 505.

Dieser vermutete Unterschied im Blutspiegel der Abbauprodukte von B 505 zwischen Maus und Kanarienvogel dürfte nicht groß genug sein, um den erheblichen Toxizitätsunterschied allein zu erklären. Außerdem ist es ungewiß, ob in beiden Tierarten qualitativ gleiche Abbauprodukte aus B 505 entstehen und ob die Folgeprodukte in gleicher Weise eliminiert werden, da wesentliche Unterschiede im Metabolismus zwischen Säuger und Vogel bekannt sind (109, 110, 40, 1).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die unterschiedliche Giftigkeit von B 505 für Maus und Kanarienvogel nicht wie erwartet durch verschiedenen hohen Konzentrationen dieser Verbindung im Blut erklärt werden kann. Wahrscheinlich sind die gefundenen quantitativen und möglicherweise auch qualitativen Unterschiede im Metabolismus von B 505 zwischen Maus und Kanarienvogel für dieses Verhalten verantwortlich.

5. Arbeitsvorschriften

5.1. Allgemeine Angaben

5.1.1. Geräte

Chromatogramm-Spektralphotometer, bestehend aus Spektralphotometer PMQ II mit Chromatogramm-Ansatz, Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., Kompensations-Linienschreiber "Servogor", 2 mV Vollausschlag, Typ 511, Metrawatt AG, Nürnberg.

Homogenisator, Typ ho, mit 100 ml Einsätzen, Edmund Bühler, Tübingen.

Kleinhomogenisator, Tissue-Grinder mit Teflonkolben, 10 ml, Thomas, Phila., USA.

Rotations-Schüttelmaschine, Typ S 20, Janke & Kunkel KG, Staufen i. Br., Ultraschallbad "Sonorex" Typ RK 82, 40 kHz, Bandelin Electronic KG, Berlin 45.

Vakuumtrockenschrank, Typ RVT, W. C. Heraeus GmbH., Hanau.

"Medvak"-Pumpe, Typ MP 1, Arthur Pfeiffer GmbH., Wetzlar.

Ott -Planimeter Nr. 19 "Elphor", Dr. Bender u. Dr. Hobein, München.

Kühlzentrifuge III KS, Martin Christ, Osterode/Harz,

dazu: Edelstahlbecher 300 ml, Reduziereinsätze für
Zentrifugiergläser, selbst gebaute Einsätze für Ampullen
siehe Abb. 16.

Abstand von der Zentrifugenmitte bis zum Boden der Becher
etwa 17 cm.

Stoffwechselkäfig für Mäuse und Kanarienvögel, siehe Abschnitt 5.2.5.

Streichgerät für DC-Platten "Unoplan", Shandon Scientific Comp. Ltd., London N.W. 10.

Trennkammer mit Knopfdeckel, Nr. 120 160, Desaga, Heidelberg

mit 2 nachträglich gebohrten Löchern im Deckel,

s. Abschnitt 5.8.

Ampullen,

weiß, 2 ml, 70 mm lang, abgeschnitten, Körper-Durchmesser:
11 - 11,5 mm, Spieß-Durchmesser: 5 - 5,5 mm,

Münnerstädter Glaswarenfabrik H. Liebmann KG., Münnerstadt.

Dosier-Kapillarpipette "Resistance" 10 μ l, Fa. Link, Wertheim.

Tuberkulinspritze, 0,5 ml, mit Edelstahlkolben, Rekord-Spritze 2 ml.

Injektionskanülen aus V2A-Stahl, Nr. 18 und 23.

Zentrifugiergläser aus "Duran 50"-Glas, Länge 100 mm, Außendurchmesser 18 mm, Wandstärke 1,5 mm, mit Schliffstopfen, NS 14,5, 9 ml.

Glasplatten von gebrauchten Fertigplatten der Firmen MERCK und WOELM,
200 x 200 mm breit, 1,0 bis 1,3 mm dick.

Deckplatte für Dünnschichtplatten zur Herstellung einer "S"-Kammer:

Glasplatte 200 x 200 x 5 mm, auf die rahmenartig an drei
Seiten 8 mm breite und 5 mm dicke Glasleisten mit Wasser-
glas aufgeleimt waren.

5.1.2. Materialien und Reagenzien

Tesakrepp Nr. 5277, 3 cm breit, Beiersdorf, Hamburg.

Melitta-Alufolie, Best.Nr. 1-2000-08.

Kieselgel HR reinst nach Stahl, MERCK, Darmstadt.

Boratpuffer-Lösung, pH 9,3, wurde nach Küster, Thiel, Fischbeck,

"Logarithmische Rechentafeln", 74.-83. Auflage, Walter de
Gruyter & Co., Berlin 1958, S.148, in doppelter Konzen-
tration, 0,4 m, bereitet. Prüfung des pH-Wertes mit der Glas-
elektrode.

Oxalatlösung: 3 %-ige Lösung von Kaliumoxalat $\cdot$ H₂O p.a., MERCK,
in dest. Wasser.

Weitere Chemikalien:

NaCl p.A., 1-Ascorbinsäure reinst, NaOH-Plätzchen reinst,

von MERCK und BHT (= 2,6-Di-tert.,-butyl-p-Kresol)

von Th. Schuchardt, München.

konz. Salzsäure, chem. rein, $d = 1,119$.

konz. Schwefelsäure, chem. rein.

5.1.3. Lösungsmittel

Diäthylamin, Isoamylacetat, Cyclohexan, Benzol, Chloroform, Äther.

Reinigung: Cyclohexan wurde 3 mal mit konz. H_2SO_4 je 1 Tag lang geschüttelt, mit 2n Natronlauge und Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet. Benzol wurde 1 mal mit konz. Schwefelsäure geschüttelt und entsprechend wie Cyclohexan weiterbehandelt.

Alle Lösungsmittel wurden über eine 40 cm lange Vigreux-Kolonne destilliert. Von Isoamylacetat verwendete man die Fraktion mit dem $K_p > 138^\circ C$.

5.1.4. Reinigung der Glasgeräte

Verunreinigungen durch biologisches Material wurden mit einem Spülmittel und einer Bürste gründlich entfernt. Zur weiteren Reinigung weichte man die Glasgeräte über Nacht in Chromschwefelsäure ein und spülte die Säure mit viel Leitungswasser und etwa 1 %iger Ammoniaklösung ab. Anschließend spülte man mindestens je 3 mal mit Leitungswasser und destilliertem Wasser nach ¹⁰⁷⁾.

5.1.5. Beschichtung und Trocknung der Dünnschichtplatten

40 g Kieselgel HR Merck und 80 ml destilliertes Wasser wurden in einem 250 ml Jodzahlkolben zu einer gleichmäßigen Suspension angeschüttelt. Diese Menge reichte aus, um 6 Glasplatten 0,3 mm dick zu beschichten. Geringe Unebenheiten der Schicht wurden durch leichtes Klopfen am Streichgerät verringert, da die Suspension von alleine sich nicht mehr ausbreitete. Nach etwa 1 Stunde wurden die Platten aus dem Gerät genommen, noch 2 - 3 Stunden waagrecht liegend an der Luft getrocknet und erst jetzt in Plattenständer gegeben. Wenn man die Platten eher in die Ständer schob, entstanden durch ungleichmäßiges Trocknen Risse in der Schicht.

Die weitere Trocknung erfolgte in senkrechter Stellung der Platten während 2 Stunden bei 80° . Anschließend wurde die Schicht bei $110-120^{\circ}$ eine halbe Stunde lang aktiviert. Nach dem Abkühlen bewahrte man die Platten in einem Exsikkator über Blaugel auf.

Bei allen Arbeitsgängen, vom Trocknen der gespülten bis zum Aufbewahren der fertigen Platten, wurde darauf geachtet, daß die Schichtseite vor jedem Staub und besonders vor Textilfusseln möglichst geschützt blieb, wegen der Gefahr der optischen Aufheller. Deshalb wurde das Streichen in einem abgelegenen Raum ohne Zugluft ausgeführt und ohne Labormantel.

5.2. Vorbereitung der Tierversuche

5.2.1. Verwendete Aminochinoline

Primaquine und Resochin wurden als Diphosphate mit einem Basengehalt von 56,9 % bzw. 62 % verwendet. Von den 6-Aminochinolinen lagen B 505 und die Verbindungen II und III als Naphthalin-1,5-disulfonate

und Verbindung IV als Monohydrochlorid vor. Der Basengehalt betrug jeweils 55,5 , 57,4 , 56,6 und 89,4 % . Bei der dünn-schichtchromatographischen Überprüfung der Reinheit der Substanzen wurden fluoreszierende Verunreinigungen bis höchstens etwa 0,05 % gefunden: dazu wurden etwa 10 µg Base pro Fleck aufgetragen, chromatographiert und nur die Nebenflecken durch Vergleich mit entsprechenden Mengen der Base ausgewertet.

5.2.2. Herstellung der Injektionslösung

Die Salze der Chinolinbasen löste man in 0,75 %iger, steriler NaCl-Lösung. Die Konzentration wählte man so, daß die pro kg gewählte Dosis in 10 ml Lösung enthalten war. Die Angabe der Dosierung wurde immer auf den Basenanteil der Salze bezogen. Die Injektionslösungen bewahrte man in der Tiefkühltruhe bei -15°C auf und erneuerte sie nach einer Woche.

Bei der Bereitung der Vergleichsproben wurde die Injektionslösung bei Bedarf mit 0,9 %iger Kochsalz-Lösung verdünnt.

5.2.3. Applikation der Injektionslösung

Einem Tier von 20 g Gewicht applizierte man mit einer Tuberkulinspritze 0,20 ml der Lösung. Den Kanarien wurde immer in die Halsvene injiziert, i.v., den Mäusen gewöhnlich in den Bauchraum, i.p., und nur in besonderen Versuchen in eine Schwanzvene, i.v.. Für die i.v.-Injektion verwendete man Kanülen Nr. 23, für i.p.-Injektion Kanülen Nr. 18.

5.2.4. Versuchstiere

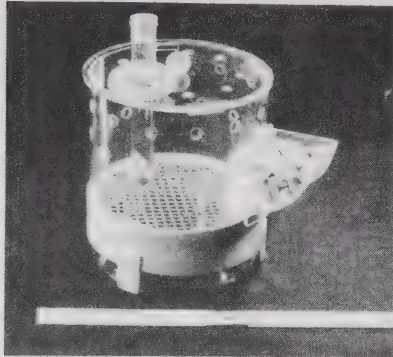
Für die Versuche mit Mäusen wurden weibliche Tiere des Stammes NMRI Orig. Kißlegg aus den Medizinischen Versuchstierzuchten S. Ivanovas, Kißlegg, Allgäu, verwendet. Sie waren 6 - 10 Wochen alt und 18-24 g schwer. Die Mäuse erhielten als Standard-Diät Altromin^R - R der Fa. Altrogge, Lage/Lippe, und Wasser ad libidum. Sie wurden bei 12 h Tageslichtbeleuchtung mit Leuchtröhren, 55-65 % relativer Feuchte und 23-25°C gehalten. Je 4 bis 5 Mäuse, deren Blut oder Leber untersucht werden sollten, befanden sich in einem Makrolon^R - Käfig (Bodenfläche ca. 400 cm²) mit einer Streu aus Sägespänen. Zum Auffangen von Exkrementen wurden die Mäuse in einen Stoffwechselkäfig gesetzt.

In den Versuchen mit Kanarien verwendete man weibliche Aufkauftiere von 18 - 23 g Körpergewicht. Die Vögel erhielten Kanarienfutter II der Fa. Arnold & Co., Bremen, und Wasser ad libidum. Sie wurden zu 2 - 3 Stück in Drahtkäfigen (Bodenfläche ca. 350 cm²) bei 18 - 22°C und 55 - 65 % relativer Feuchte gehalten.

5.2.5. Beschreibung der Stoffwechselkäfige

Mäuse: Der selbstgebaute Käfig (Abb. 15), von kreisförmigem Querschnitt, hatte einen Durchmesser von 19 cm und war 20 cm hoch. Die Wände und der Deckel bestanden aus Plexiglas und besaßen mehrere große Luftlöcher. Etwa 6 cm über dem Boden war ein Gitter aus verzinktem Draht von 1 cm Maschenweite eingelegt, auf dem sich die Mäuse aufhalten konnten. Darunter befand sich eine Glasschale von 19,5 cm Durchmesser. Die Futterkrippe hing an der Außenseite des Käfigs und war unten offen, so daß Futterkrümel außen auf den Boden fielen und nicht in die untergestellte Glasschale. Durch 2 Löcher in der Wand, etwa 5 cm über dem

Abbildung 15 Stoffwechselkäfig für Mäuse



Drahtnetz, konnten die Mäuse das Futter erreichen, dabei aber das Drahtnetz nicht verlassen. Durch den Deckel hing ein dickwandiges, wassergefülltes Reagenzglas, Durchmesser 2,5 cm, Länge 18 cm, in den Käfig, dessen Öffnung mit einem Gummistopfen verschlossen war und an dessen Boden ein Loch von etwa 2 mm Durchmesser das Saugen des Wassers gestattete.

Kanarien: Zum Auffangen der Exkremente wurden die Einsätze der Vogelkäfige mit einer etwa 1 mm dicken Glasfibermatte ausgelegt. Um ein Ankleben am Boden durch Exkremente zu vermeiden, legte man diese Matte auf zwei Glasstäbe auf, die am Boden angeklebt waren. Etwa 3 cm darüber brachte man ein Drahtgitter mit 2 cm Maschenweite an, das die Vögel von den Exkrementen fernhielt.

5.3. Gewinnung von Proben aus biologischem Material

5.3.1. Blut

Maus: Die Menge des abgenommenen Blutes richtete sich nach der zu erwartenden Konzentration an Chinolin-Derivaten und ist der Tabelle 15a zu entnehmen.

Tabelle 15a

Von Mäusen aufgefangene Blutmenge in Abhängigkeit
von der erwarteten Substanzkonzentration

Erwartete Konzentration im Blut [ng / ml]	Tropfen Blut pro Maus	ml Blut von 5 Mäusen	Verdünnungs- verhältnis ^{x)}
3 000	6	1,0	1 : 10
1 500	12	2,0	1 : 10
800	24	4,0	1 : 10
400	5	0,8	-
200	10	1,6	-
100	18	3,0	-
50	18	3,0	-
5	18	3,0	-

x) siehe Kap. 5.4.1.

Zum Auffangen des Blutes stellte man eine gewogene Vorlage bereit in Form eines weithalsigen 25 ml Erlenmeyer-Kolbens mit 5,0 ml Oxalatlösung als Inhalt. In einem Glas mit äthergetränkten Mulltupfern wurden die Mäuse narkotisiert. Durch leichtes Spannen der Haut am Hals staute man das Blut im Kopf und riß mit einer chirurgischen Pinzette, etwa 10 cm lang, ein Auge aus. Das sofort austretende Blut ließ man in die Vorlage tropfen, die gleichzeitig umgeschwenkt wurde. Anschließend wur-

den die Mäuse im Glas mit Äther getötet.

Nachdem man auf diese Weise etwa gleiche Blutmengen von 5 Mäusen in derselben Vorlage aufgefangen hatte, bestimmte man durch Auswiegen das Blutgewicht. Das Blutgewicht rechnete man durch Division mit 1,03 , dem spezifischen Gewicht des Blutes, in ml um, ermittelte die Differenz zu 10 ml Gesamtvolumen und fügte diese Menge Oxalat-Lösung zu. Dieses Oxalatblut wurde mit Aluminiumfolie verschlossen und in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Kanarien: In einer 2 ml Spritze, auf der eine Kanüle Nr.18 steckte, legte man 1,00 ml Oxalatlösung vor, zog 0,5 ml Blut aus der Halsvene nach und füllte in der Spritze mit Oxalatlösung auf 2,00 ml auf. Man entfernte die Kanüle, zog den Kolben ganz zurück, mischte den Inhalt durch Umschwenken gründlich durch und entleerte die Spritze in einen 25 ml Weithals-Erlenmeyerkolben. Auf diese Weise wurde das Blut von 4 - 5 Kanarien abgenommen und gemischt. Das Oxalatblut wurde mit Aluminiumfolie verschlossen in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Die Kanarien wurden mit Äther getötet.

5.3.2. Exkrementen

Maus: In die Bodenschale des Stoffwechselkäfigs füllte man 100 ml 0,8 %ige Schwefelsäure, setzte 5 Mäuse ein und sammelte den in 24 Stunden ausgeschiedenen Kot und Urin. Nach dieser Zeit wurde die Schale mit dem Drahtgitter in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Kanarien: In 2 entsprechend vorbereitete Käfige setzte man 5 Kanarienvögel und sammelte 24 Stunden lang die Ausscheidungen. Das Gitter und die Glasfibermatte mit den Exkrementen bewahrte man in der Tiefkühltruhe auf.

5.3.3. Leber

In einem Glasgefäß mit Äther wurden die Mäuse narkotisiert und die Vögel getötet. Die Tiere spannte man mit Nadeln auf einer Paraffinplatte auf. Nun wurde der Bauchraum aufgeschnitten, die Leber herauspräpariert und die Gallenblase entfernt. Die Leber spülte man mit Wasser ab und trocknete sie mit Filtrierpapier. Anschließend wurde sie auf Aluminiumfolie gelegt, gewogen, in einem niedrigen Dewar-Gefäß mit Trockeneis eingefroren und in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Diese Operationen dauerten bei der Maus etwa 5 Min., beim Vogel etwa 7 Min..

5.3.4. Vergleichsproben

Zur Berechnung der Blut-Analysenproben diente bei jeder Analyse eine gleichzeitig aufgearbeitete Vergleichsprobe, die aus Oxalatlösung, Injektionslösung und Blut bereitet wurde mit demselben Anteil von Blut wie die Analyse. Der Gehalt des Oxalatblutes an Substanz wurde mit Oxalatlösung meistens auf 50 ng in 2 ml eingestellt, wobei der Blutanteil sich nach der Analyse richtete. Die Zugabe von Substanz zu Exkrementen und Lebergewebe ist in Kap. 3.4.2. beschrieben.

5.4. Extraktion der Proben

5.4.1. Hämolyse und Extraktion von Oxalatblut

Hämolyse: Das Oxalatblut hämolysierte man durch dreimaliges Einfrieren in der Tiefkühltruhe oder einer Eis-Kochsalz-Mischung und zentrifugierte es eine halbe Stunde lang bei 4000 U/min.

Verdünnung: Der klare Überstand wurde entsprechend dem in Tab. 15a für Mäuseblut bzw. in Tab. 15b für Kanarienvogel angegebenen Verhältnis mit Oxalatlösung verdünnt.

Tabelle 15b

Verdünnung von hämolysiertem, zentrifugiertem Oxalatblut vom Kanarienvogel entsprechend vermutlicher Substanzkonzentration.

Konzentration in Blut ng/ml	Verdünnungs- verhältnis
2000	1 : 16
1000	1 : 8
500	1 : 4
250	1 : 1
120	-
60	-
6	-

Durch das Auffangen unterschiedlicher Blutmengen bzw. durch das Verdünnen des Oxalatblutes erreichte man, daß nach der Aufarbeitung von Blutproben mit einer Konzentration von etwa 100 ng pro ml und darüber jeweils etwa 50 ng pro Startfleck aufgetragen wurden. Bei geringerer Konzentration, z.B. 50 oder 5 ng pro ml Blut, verminderte sich die Menge pro Startfleck auf die Hälfte, z.B. auf 25 bzw. 2,5 ng.

Extraktion: Das entsprechend verdünnte Oxalatblut wurde unterteilt in 2 bis 4 2,0 ml-Anteile, welche nebeneinander aufgearbeitet wurden.

In ein Zentrifugierglas mit eingeschliffenem Stopfen pipettierte man 2,00 ml des klaren Oxalatblutes, fügte eine kleine Spatelspitze, etwa 5 mg,

Ascorbinsäure, 3,00 ml Isoamylacetat, das 0,2 % BHT enthielt, und 2,0 ml Pufferlösung, pH 9,3, zu. Nach dem Begasen mit Stickstoff wurden die Gläser in waagrecht Lage eine halbe Stunde lang mit kreisender Bewegung maschinell geschüttelt und ohne Stopfen 10 min lang bei 4000 U/min zentrifugiert. Von der organischen Phase ließen sich etwa 2,5 ml durch Abpipettieren gewinnen.

5.4.2. Zerkleinerung und Extraktion von Exkrementen

Die Glasfiebermatte mit den Ausscheidungsprodukten der Kanarien wurde mit einer Schere in kleine, bis 1 cm² große Stücke geschnitten, die Stücke in einen 100 ml Homogenisator-Einsatz gefüllt und mit 100 ml 0,8 % iger Schwefelsäure übergossen. Die am Drahtgitter haftenden Teile wurden abgekratzt und dazugegeben.

Die Exkremente von Mäusen überführte man in einen gleichen Einsatz und spülte die Glasschale sowie das Drahtgitter mit möglichst wenig destilliertem Wasser mehrmals nach.

Der Inhalt der Einsätze wurde 5 Min. lang auf Stufe 12 unter Wasserkühlung mit dem Homogenisator zerkleinert und noch 5 Min. auf Stufe 1 weitergerührt, damit die Suspension zusammenlaufen konnte. Diese füllte man in einen 250 ml Rundkolben NS 29 mit einer Markierung bei 140 ml und spülte mit soviel dest. Wasser nach, daß ein Gesamtvolumen von 140 ml nicht überschritten wurde. Man pipettierte 30,0 ml Isoamylacetat (A), das 0,2 % BHT enthielt, ein, setzte 100 mg Ascorbinsäure, gelöst in etwa 1 ml Wasser, dazu und fror den Kolben, nachdem man ihn 2 Min. lang ins Ultraschallbad gehalten hatte, in einer Eis-Kochsalz-Mischung ein. Nach Zugabe von 60 ml eisgekühlter, 50 % iger Natronlauge begaste man mit Stickstoff, schwenkte einige Male um, bis sich der

gefrorene Bodensatz von der Wand ablöste und schüttelte den Kolben 1 Stde. lang heftig auf der Schüttelmaschine. Anschließend überführte man die Emulsion in einen Edelstahlbecher und trennte die Phasen durch halbstündiges Zentrifugieren bei 4000 U/Min. Von der organischen Phase ließen sich etwa 20 ml durch Abpipettieren gewinnen.

5.4.3. Zerkleinerung und Extraktion von Lebergewebe

Zum Zerkleinern benutzte man den Kleinhomogenisator, dessen Stempel an einen regelbaren Rührmotor angeschlossen wurde.

Die noch tief gefrorenen Lebern (Kap. 5.3.3.) wurden in einer Menge bis zu etwa 5 g unter Zugabe von 4,5 ml eisgekühlter 0,9 %iger NaCl - Lösung bei einer Drehzahl von etwa 800 U/Min. 2 Min. lang homogenisiert. Danach wurde die Suspension in einem Eisbad gekühlt und noch einmal 2 Min. lang homogenisiert. Den Leberbrei goß man in einen 100 ml Rundkolben mit NS 29, spülte mit 20 ml eisgekühlter Kochsalzlösung nach und pipettierte 20,0 ml Isoamylacetat (A), das 0,2 % BHT enthielt, dazu. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurde der Kolben zwei Min. lang ins Ultraschallbad von 20° gehalten und danach der Inhalt in einer Eis-Kochsalz - Mischung eingefroren. Nun setzte man 30 ml eisgekühlte, 50 %ige Natronlauge zu, leitete Stickstoff in den Kolben und schüttelte 1 Stde. lang maschinell.

Anschließend überführte man die Emulsion in einen Edelstahlbecher und trennte die Phasen durch einstündiges Zentrifugieren bei 4000 U/Min. Von der organischen Phase ließen sich etwa 15 ml durch Abpipettieren gewinnen.

5.5. Ausschütteln der organischen Phase mit Säure

Lag die Konzentration in der organischen Phase wie bei Exkrementen und Lebern vermutlich über 100 ng pro ml, so schüttelte man sie in einem Zentrifugierglas mit Schliffstopfen aus, lag er darunter, wie bei verdünntem Oxalatblut, verwendete man eine Ampulle.

5.5.1. Ausschütteln im Zentrifugierglas

Man pipettierte die nach der Tab. 16 zu verwendende Menge (B) organische Phase in ein Zentrifugierglas mit Schliffstopfen und fügte die aus der

Tabelle 16

Anpassung der Säuremenge an die Substanzkonzentration in der organischen Phase, um ein konstantes Auftragsvolumen zu erhalten.

Vermutete Konzentration in der organ. Phase in $\mu\text{g} / \text{ml}$	B = Eingesetzte ml org. Phase	C = Eingesetzte ml 2n HCl	D = Auftragsvolumen in ml
20	1,00	4,00	0,010
10	2,00	4,00	0,010
5	3,00	3,00	0,010
2,5	4,00	2,00	0,010
1,2	6,50	1,50	0,010
0,6	7,50	1,00	0,010
0,3	7,50	0,50	0,010
0,1	7,50	0,50	0,030

Tab. 16 ersichtliche Menge (C) $2n$ HCl mit einem Gehalt von 1 % Ascorbinsäure dazu. Das Zentrifugierglas hielt man 2 Min. lang in das Ultraschallbad und schüttelte es zwischendurch immer wieder kräftig mit der Hand, um die Phasen zu mischen. Anschließend wurde das Glas ohne Stopfen 15 Min. lang bei 4000 U/Min. zentrifugiert. Die überstehende organische Phase wurde möglichst vollständig mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Um die Säure von Schwebestoffen an der Phasengrenze abzutrennen, zog man sie in eine Pipette mit dünner Spitze vorsichtig auf und ließ sie in ein kleines Reagenzglas auslaufen. Diese salzsaure Analysenlösung wurde mit einer 10 μ l Kapillarpipette entsprechend Kap. 5, 7. auf 2 - 4 Bahnen der Dünnschichtplatte aufgetragen. Das jeweils verwendete Auftragvolumen kann der Tab. 16 entnommen werden.

5.5.2. Ausschütteln in einer Ampulle

Waschen der organischen Phase: Die organische Phase bei Lebern oder Exkrementen mit niedrigen Substanzgehalten wurde in einem 100 ml Rundkolben NS 29 unter Stickstoff mit 30 ml 20 prozent. Natronlauge 10 Min. lang maschinell geschüttelt. Nach dem Umgießen in einen Edelstahlbecher zentrifugierte man 10 Min. lang bei 4000 U/Min.

Die bei Blut erhaltene organische Phase pipettierte man in ein Zentrifugierglas, das 3 ml 20 prozent. Natronlauge enthielt und begaste es vor dem Verschließen mit Stickstoff. Nun wurde das Zentrifugierglas 15 Min. lang in waagerechter Lage maschinell kreisend geschüttelt und anschließend 10 Min. lang bei 4000 U/Min. zentrifugiert.

Einfüllen der organischen Phase und Salzsäure in die Ampulle: Man spülte eine 5 ml Meßpipette mit etwa 5 ml Isoamylacetat unter Zusatz von einem Tropfen Diäthylamin, ließ sie auslaufen und füllte damit je 2,5 ml der

gewaschenen organischen Phase in eine mit CO_2 begaste Ampulle. Anschließend wurde eine frisch hergestellte, fünfproz. Lösung von Ascorbinsäure in 20 %iger Salzsäure zugegeben. Zum Einfüllen von 20 μl Säure in die Ampulle bediente man sich einer aus einem Schmelzpunktröhrchen selbst hergestellten Mikropipette mit umgebogener Spitze, an der zwei Eichmarken angebracht waren. Die Spitze dieses gefüllten Röhrchens führte man bis an die Einschnürung der Ampulle und ließ durch Anliegen an die Wand die Säure bis zur unteren Eichmarke herauslaufen.

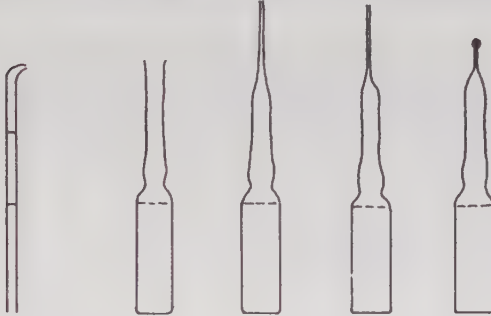
Verschließen der Ampulle: Zum Verschließen der Ampulle wurde ein Ampullenverschlußbrenner mit zwei in 5 cm Abstand gegeneinander gerichteten Düsen verwendet. Mit Hilfe einer Pinzette zog man, wie in Abb. 16 gezeigt wird, das obere Ende des Ampullenspießes zunächst zu einer dicken Kapillare aus. Durch nochmaliges Ausziehen verringerte man die Wandstärke und das Lumen so weit, daß man eine dünnwandige, aber trotzdem stabile Kapillare erhielt, deren Ende zu einem Glaskügelchen verschmolzen wurde.

Mischen des Ampulleninhaltes, Zentrifugieren der Ampulle: Der Körper der verschlossenen Ampulle wurde 2 Min. lang in das zimmerwarme Ultraschallbad gehalten und zwischendurch mehrmals kräftig von Hand geschüttelt.

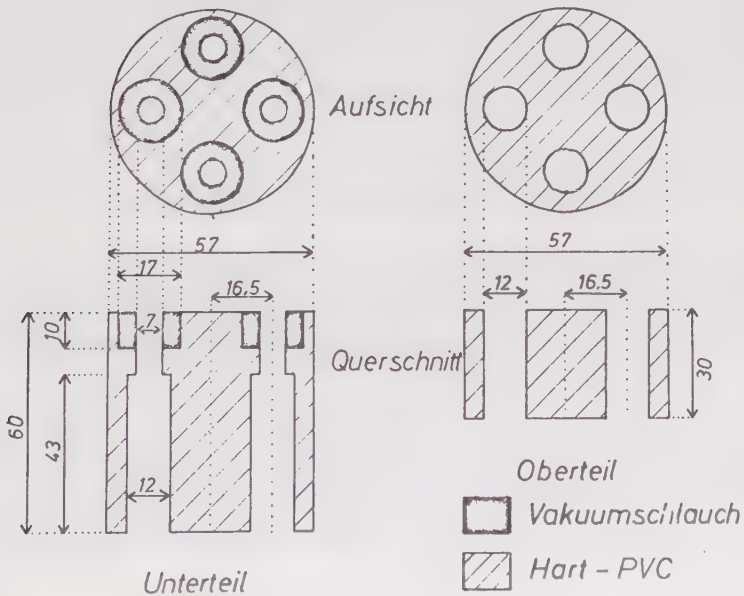
Danach steckte man die Ampulle mit der Spitze nach unten in die in Abb. 16 beschriebenen Einsätze und zentrifugierte 15 Min. lang bei etwa 4000 U/Min. Die salzsaure Analysenlösung sammelte sich dabei praktisch vollständig in der Ampullenspitze.

Abbildung 16

- a) Pipette zum Einfüllen der Salzsäure;
Verschließen der Ampulle



- b) Einsatz für den Zentrifugenbecher zum Zentrifugieren
von Ampullen, Maße in mm.



5. 6. Herstellung der Vergleichslösungen für die DC

Die in Kap. 5. 2. 2. beschriebenen Injektionslösungen dienten als Stammlösungen und wurden mit frisch hergestellter 2n HCl, die 1 % Ascorbinsäure enthielt, jeweils vor Gebrauch nach folgendem Schema entsprechend ihrem Gehalt verdünnt:

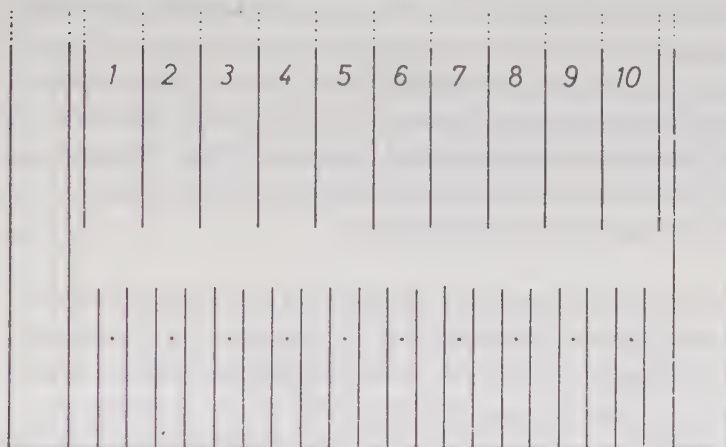
	Stammlösung	Verdünnung
20	mg/kg/10 ml :	0,100 ml ad 1,00 ml, davon 0,100 ml ad 4,00 ml
5	mg/kg/10 ml :	0,100 ml ad 10,00 ml
2,5	mg/kg/10 ml :	0,100 ml ad 5,00 ml

Als Vergleich zur Auswertung von Analysen von Exkrementen und Leber und zur Bestimmung der Ausbeute in Zusatzversuchen (Kap. 3. 4. 2.) wurden von den erhaltenen salzsauren Lösungen je 10 µl, gleich 50 ng Substanz, mit einer Kapillarpipette entsprechend Kap. 5. 7. auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

5. 7. Vorbereitung der Dünnschichtplatte für die Chromatographie

Einteilung der Schicht in Bahnen: Die Schicht wurde entsprechend Abb. 17 mit Hilfe einer untergelegten Schablone in zehn Bahnen aufgeteilt. Um die Strichenden besser erkennen zu können, wurde die Schicht zuvor an Ober- und Unterkante etwa 5 mm breit entfernt. Die Striche wurden entlang einem hohl gelegten Lineal mit dem runden Ende eines Schmelzpunktsröhrchens in die Schicht gekratzt, und das nicht benötigte Kieselgel abgestreift. Anschließend wurde der lose haftende Kieselgelstaub vorsichtig weggeblasen, um ein Kriechen der Auftragslösung oder des Fließmittels über

Abbildung 17 Einteilung der Schicht in Bahnen
Randstreifen und Bahnbreite: 16 mm



die schichtfreie Glasoberfläche zu verhindern.

Die salzsauren Analysen- und Vergleichslösungen setzte man nicht nebeneinander auf, sondern verteilte sie möglichst gleichmäßig auf die zehn Bahnen, z. B. nach folgendem Schema: Vergleichslösung auf die Bahnen 1, 4, 7 und 10, Analysenlösung A auf die Bahnen 2, 5 und 8 und Analysenlösung B auf die Bahnen 3, 6 und 9.

Um das Auftragen zu erleichtern, wurde die Deckplatte als Brücke über die Dünnschichtplatte gelegt. Sie ermöglichte das Auflegen der Hand und das Anlehnen von Pipette oder Ampullenspitze beim Auftragen.

Beim Auftragen mit der Ampullenspitze wurde die Ampulle mit der Spitze nach unten an ihrem Spieß festgehalten und an der Einschnürung mit einer Feile angeritzt. Der Ampullenkörper wurde abgebrochen und verworfen. Dabei ließ es sich nicht vermeiden, daß organisches Lösungsmittel über die

Finger lief. Mit einer schmalen Tropfpipette saugte man den größten Teil der organischen Phase aus der Ampullenspitze heraus und trocknete sie von außen mit Filtrierpapier vorsichtig ab. Es erforderte einige Übung, das Glaskügelchen an der Ampullenspitze nun so abzubereiten, daß möglichst wenig von der Kapillare mit abgebrochen wurde. Ich ging so vor, daß ich das verbliebene Ampullenstück oben mit der einen Hand festhielt, das Kügelchen der ausgezogenen Spitze zwischen die Fingernägel von Daumen und Mittelfinger der anderen Hand einklemmte und unter Zug und leichtem Verkanten das Kügelchen abbrach.

Beim Aufsetzen der nun eröffneten Kapillare auf die Schicht lief die wässrige Phase praktisch vollständig aus. Ein Nachlaufen von organischer Phase wurde möglichst vermieden. Wenn die Austrittsöffnung der Kapillare nicht weit genug war oder sich beim Aufsetzen mit Kieselgel verstopfte, drückte man sie kräftiger auf die Schicht und brach unter leichtem Drehen ihr vorderes Stück ab. Das dabei in der Schicht entstehende Loch und die Glasreste störten beim Chromatographieren nicht.

Beim Auftragen mit der Kapillarpipette wurde darauf geachtet, die Schicht möglichst nicht zu berühren. Dadurch sollte verhindert werden, daß Anteile des Startflecks, die bereits mit der Lösung getränkt waren, an der Pipette hängen blieben.

Alle Lösungen für ein Chromatogramm wurden mit derselben Kapillarpipette aufgetragen, wobei man dieselbe nach jedem Aufsetzen mit der nächsten Lösung füllte, zum Entleeren auf Filtrierpapier aufsetzte und das Verfahren 1 - 2 mal wiederholte. Dabei ließ sich gleichzeitig prüfen, ob die Kapillarpipette sich bis zur vorgeschriebenen Höhe füllte und wieder vollständig auslief. Bei Lösungen mit geringer Oberflächenspannung, die sich z. B. bei der Aufarbeitung von Exkrementen ergaben, war es zur richtigen Füllung notwendig, die Kapillarpipette schräg in die salzsauren Lösungen einzutauchen.

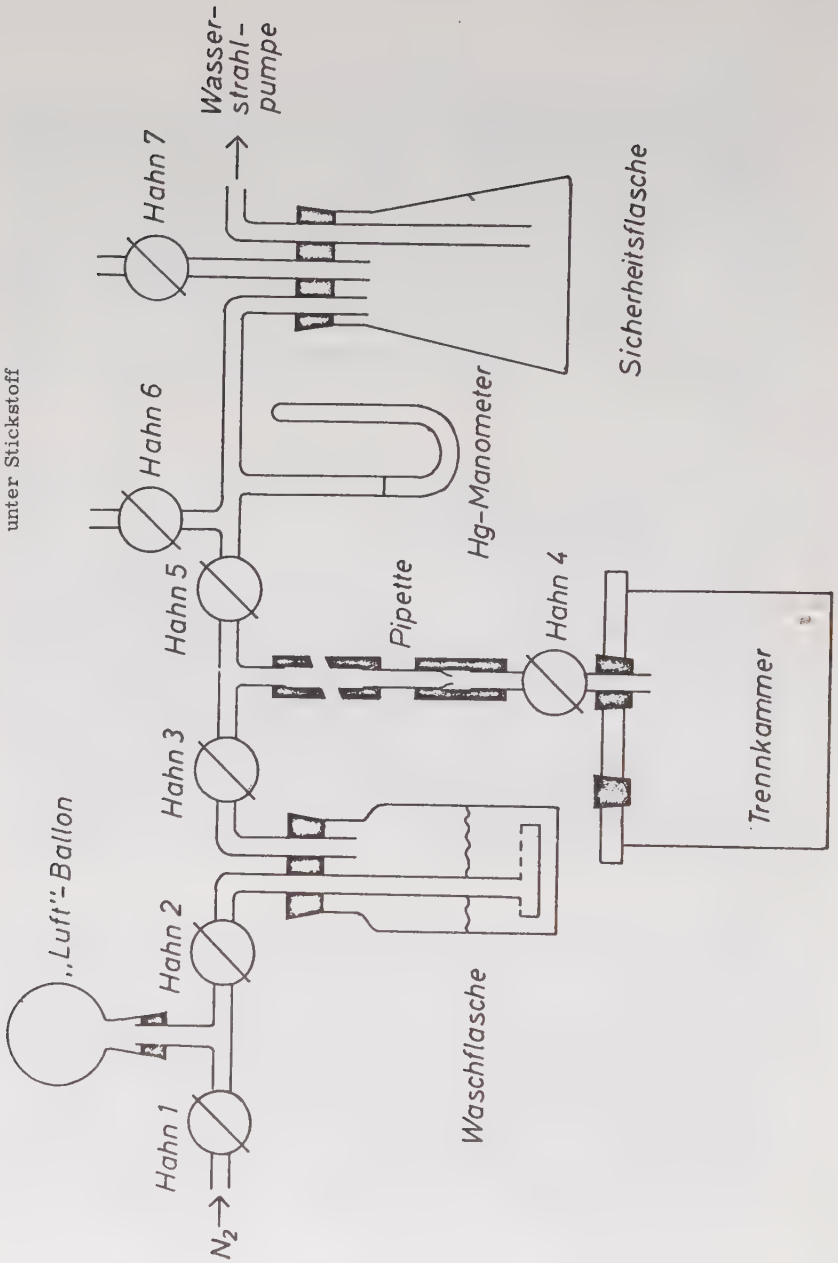
Zum Trocknen der Startflecken ließ man nach dem Auftragen der Proben die Dünnschichtplatte noch etwa 5 Min. lang liegen, bis die Startflecke gleichmäßig groß und hell aussahen. Dann brachte man die Platte in einen Vakuum-Trockenschrank, der auf 50° vorgeheizt war, und evakuierte auf etwa 10 Torr. Um möglichst schnell arbeiten zu können, verwendete man 3 parallel geschaltete Wasserstrahlpumpen mit einer vorgeschalteten Medvak-Pumpe. Nach einer halben Stunde nahm man die Platte heraus, ließ sie etwa 10 Minuten an der Luft abkühlen und stellte sie in die Trennkammer.

5.8. Chromatographie unter N₂

Auf den Boden der Desaga-Trennkammer wurden zwei Glasplatten (5 cm x 20 cm x 0,5 cm) gelegt, um Fließmittel einzusparen. Daneben stellte man anschließend die Dünnschichtplatte möglichst steil in das Gefäß. Vor dem Verschließen der Trennkammer bestrich man den Schliff mit einer Anreibung von 15 Teilen Kieselgel HR mit 35 Teilen Glycerin und setzte den Deckel unter kreisender Bewegung auf, damit sich das Schmiermittel gleichmäßig verteilte. Danach wurde die Trennkammer an die in Abb. 18 beschriebene Vorrichtung zum Evakuieren und Begasen angeschlossen.

Vorbereitung der Vorrichtung (Abb. 18): Zunächst füllte man den Ballon durch wiederholtes Aufblasen und Ablassen luftfrei mit Stickstoff. Dann wurden etwa 60 ml Fließmittel in die Waschflasche gefüllt und ihr Schliff gut eingefettet. Nachdem man sie mit einem Schutzgitter umgeben hatte, wurde sie bei geschlossenem Hahn Nr. 4 bis etwa 100 Torr evakuiert. Nach Schließen von Hahn 3 füllte man die Waschflasche mit Stickstoff aus dem Ballon wieder auf. Dieser Vorgang wurde 3 bis 4 mal wiederholt.

Abb. 18 Vorrichtung zum Chromatographieren
unter Stickstoff



Evakuieren und Begasen der Trennkammer: Vor dem Evakuieren umgab man die Trennkammer mit einem Schutzgitter und überzeugte sich nochmals vom richtigen Sitz des Deckels. Während des Druckabfalles beobachtete man den Schliff, ob nicht Kanäle und damit undichte Stellen auftraten. Wenn der Druck auf etwa 15 Torr gefallen war, wurde Hahn 5 geschlossen. Jetzt ließ man Stickstoff aus dem Ballon durch die Waschflasche in die Trennkammer einströmen und regelte den Gasfluß mit Hahn 3 so, daß das Fließmittel in der Waschflasche nicht schäumte. Die Waschflasche, die sich beim Durchleiten des Stickstoffs abkühlte, wurde durch Eintauchen in ein Wasserbad von etwa 40°C auf Raumtemperatur gehalten. Sobald aus dem Ballon kein Stickstoff mehr einströmte, wurde das Wasserbad entfernt. Gleichzeitig öffnete man Hahn 5, damit der Überdruck aus dem Ballon nicht den Trennkammerdeckel abheben konnte, und reduzierte den dabei rascher werdenden Stickstoffstrom aus dem Ballon mit Hahn 3. Dadurch wurde in der Trennkammer noch ein sehr geringer Überdruck aufrechterhalten, der beim Einfüllen des Fließmittels durch das kleine Loch im Deckel der Trennkammer ein Eindringen von Luft verhinderte.

Einfüllen des Fließmittels und Entwicklung des Chromatogramms:

Zum Einfüllen des Fließmittels benutzte man einen Trichter mit langem Stiel, der bis zum Boden reichte und dessen Spitze verengt war, damit das Fließmittel ohne Spritzen auslief.

Während des Entwickelns wurde die Trennkammer zum Schutz vor Licht mit einem Tuch bedeckt und der Stickstoffüberdruck wiederholt nachgeregelt, da der Druck des Ballons allmählich nachließ. Wenn nötig, füllte man den Ballon mit Stickstoff aus der Bombe nach. Man entwickelte etwa eine Stunde lang, bis das Fließmittel den oberen Rand der Schicht erreicht hatte.

5.9. Vorbereitung des Chromatogramms zur Messung

5.9.1. 6-Aminochinoline

Während das Chromatogramm entwickelt wurde, legte man für den folgenden Arbeitsgang die Deckplatte für die Dünnschichtplatten sowie den Klebestreifen bereit.

Der zum Abdichten der "S"-Kammer benützte Tesakrepp wurde auf der Innenseite in Längsrichtung mit etwa 1 cm breiten Streifen aus dünner Aluminiumfolie abgedeckt, um zu verhindern, daß Reste des Fließmittels die Klebstoffmasse erweichte. Von diesem Klebestreifen legte man ein etwa 30 cm langes Stück bereit neben einem großen Stück Filtrierpapier.

Wenn das Chromatographieren beendet war, öffnete man die Trennkammer und drückte noch in der Trennkammer möglichst rasch die bereitgehaltene Deckplatte mit der Öffnung nach unten gegen die Dünnschichtplatte. Die so entstandene "S"-Kammer wurde nun unverzüglich aus der Trennkammer herausgenommen und senkrecht auf das bereitgelegte Filtrierpapier gestellt, um das an der Unterkante hängende Fließmittel abzusaugen, wobei Deckplatte und Dünnschichtplatte seitlich mit zwei Aktenklammern aneinander gedrückt wurden. Anschließend stellte man die "S"-Kammer mit der waagerechten, offenen Unterkante auf die Mitte des bereitgelegten Klebestreifens und klebte sie durch Hochziehen des überstehenden Randes zu. An den unteren Ecken der "S"-Kammer wurden die beiderseits überstehenden Teile des Klebestreifens senkrecht entlang der Kante eingeschnitten und an den Seiten überlappend festgeklebt. Nun konnte die "S"-Kammer mit der Deckplatte nach unten liegend mit weiterem Klebestreifen an den Kanten fortlaufend verklebt werden, wobei die Stücke des Klebestreifens nicht übereinander geklebt wurden. Die noch freien Fugen zwischen den Stücken und die Ecken dichtete man mit Stücken von normalem Tesakrepp

ab. Es durften höchstens drei Lagen übereinander geklebt werden, da sonst der Meßkopf vom Auswertgerät nicht weit genug gesenkt werden konnte.

Man legte die abgedichtete "S"-Kammer mit der Dünnschichtplatte nach oben und leicht abwärts geneigt in Laufrichtung des Chromatogramms auf den Arbeitstisch. Durch drei- bis viermaliges Auflegen eines saugfähigen Schwanntuches, das mit etwa 60° heißem Wasser getränkt war, verdampfte man das Fließmittel aus der Schicht, das im übrigen Teil der "S"-Kammer kondensierte.

Nach etwa 20 Minuten, in denen sich die "S"-Kammer wieder abgekühlt hatte, wurde die Rückseite der Dünnschichtplatte mit methanolgetränktem Filterpapier möglichst fusselfrei gereinigt. Das Chromatogramm war nun fertig zur Messung.

5.9.2. Resochin

Nach dem Entwickeln ließ man das Fließmittel 20-30 Sekunden an der Luft verdunsten, bis die Schicht weiß-grau aussah, und deckte das Chromatogramm mit einer unbeschichteten Glasplatte ab. Die Bahn, die als nächste gemessen werden sollte, wurde durch Verschieben der Glasplatte freigelegt. Man wartete etwa 30 Sekunden mit der Messung, bis das restliche Fließmittel verdunstet war und die Schicht rein weiß erschien.

5.9.3. Primaquine

Das entwickelte Chromatogramm trocknete man 20 Minuten lang in einem Vakuum-Trockenschrank bei 50° und 15 Torr. Nach dem Abkühlen wurde die Dünnschichtplatte etwa 10 Sekunden lang in eine Lösung von 100 ml konzentrierter Schwefelsäure in 1 l Äther getaucht. Das Eintauchen und

Herausziehen mußte zügig ausgeführt werden, damit die Schicht gleichmäßig benetzt wurde. Nach dem Verdunsten des Äthers deckte man die Schicht zum Schutz vor Feuchtigkeit mit einer unbeschichteten Glasplatte ab. Die mit Schwefelsäure benetzte Rückseite und die Plattenränder wurden mit Filtrierpapier abgewischt. Die Bahn, die als nächste gemessen werden sollte, wurde durch Verschieben der Glasplatte freigelegt.

5.10. Direkte fluorometrische Bestimmung

5.10.1. Einstellungen am Meßgerät

Die Hg-Dampf-Lampe, die bei 220 V betrieben wurde, und der Verstärker teil wurden 1/4 Stunde vor Beginn der Messung eingeschaltet.

Folgende Einstellungen der Geräte wurden konstant gehalten:

Hg-Lampe	:	220 V
Meßfläche	:	Spalt
Monochromatorspalt	:	2,0
Tischvorschub	:	Stufe 3
Papiervorschub	:	120/Min.
Meßbereichschalter am Schreiber	:	2,5 oder 10 mV calib., je nach Substanzmenge.

In Tab. 17 sind die Filter für die Auswahl des Anregungslichtes und die zur Messung der Fluoreszenz günstigsten Wellenlängen aufgeführt. In der Spalte "Verstärkung" werden diejenigen Schalterstellungen des Anzeige-gerätes angegeben, die in der Regel zur Messung von 50 ng Substanz pro Fleck verwendet wurden. Für B 505 sind in Klammern Werte angegeben, die durch das Auftreten einer fluoreszierenden Störsubstanz bei Exkremen-ten und Leber von Mäusen benötigt wurden.

Tabelle 17

Zur Messung verwendete Wellenlängen des Anregungs- und Fluoreszenzlichtes sowie Schalterstellungen am Anzeigergerät.

Verbindung	Wellenlängen in nm		Verstärkung
	Anregung	Messung	
Primaquine	365	440	I / 1 / 3
Resochin	313	370	I / 1 / 8
III	365	480	I / 1 / 3
II	365	480	I / 1 / 3
IV	365	480	I / 1 / 3
B 505	365	480	I / 1 / 3
	(365	560	I / 1 / 10)

5.10.2. Ausführung der Fluoreszenzmessung

Der Meßkopf wurde möglichst nahe über das Chromatogramm gesenkt und ein von fluoreszierender Substanz freier Ausschnitt der Schicht unter den Meßspalt geschoben. Mit Hilfe der Nullpunktverschiebung des Schreibers unterdrückte man den vom Plattenuntergrund herrührenden Ausschlag. Nun brachte man den zu messenden Fleck in die Mitte des Meßspaltes und schob den Kreutztisch ohne seitliche Verschiebung nach hinten, bis der Startfleck im Meßspalt erschien. Durch gleichzeitiges Einschalten des Papiervortriebs und des Kreutztischmotors wurde die Fluoreszenz-Intensitäts-Ortskurve der Bahn in Laufrichtung des Chromatogramms aufgezeichnet.

Zur Aufzeichnung der Peakflächen mit dem Kompensationsschreiber verwendete man eine Kugelschreibermine und rauhes Konzeptpapier DIN A 4, das sich zum Planimetrieren besser eignete als das glatte Diagrammpapier.

5.10.3. Auswertung der Fluoreszenzintensitätsortskurven

Die Peakflächen wurden planimetriert und in Planimeteereinheiten (PE) angegeben. War die Registrierung der Kurven bei unterschiedlicher Einstellung des Meßbereiches am Schreiber durchgeführt worden, rechnet man die erhaltenen Peakflächen auf einen für alle Flecke gleichen Meßbereich um. Aus den Peakflächen, die zu derselben Analysenprobe oder zu derselben Vergleichsprobe oder Vergleichslösung gehörten, bildete man arithmetische Mittelwerte.

5.10.4. Berechnung der Analysen

Blut: Bei der Bestimmung der Aminochinoline im Blut diente die in Kap. 5.3.4. beschriebene Vergleichsprobe als äußerer Standard. Die Berechnung des Gehaltes der Analysenprobe bzw. des Blutes ließ sich nach folgenden Gleichungen durchführen:

$$\frac{\text{Peakfläche (Analyse)}}{\text{Peakfläche (Vergleichsprobe)}} = \frac{A}{B} \quad \text{und}$$

$$\text{Konzentration im Analysenblut } \left[\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right] = \frac{A}{C}$$

A = ng Substanz in 2 ml Oxalatblut der Analysenprobe

B = ng Substanz in 2 ml Oxalatblut der Vergleichsprobe

C = ml Blut in 2 ml Oxalatblut der Analysenprobe

Exkremente und Lebergewebe: Die Berechnung derjenigen Substanzmenge, die sich in der aufgearbeiteten Analysenprobe befand, ließ sich nach folgender Gleichung ermitteln:

$$\text{Gehalt der Analysenprobe } \left[\text{ng} \right] = \frac{\text{Fläche (Analyse)}}{\text{Fläche (Vergleich)}} \times E \times \frac{A}{B} \times \frac{C}{D} \times \frac{100}{R}$$

- A = ml Isoamylacetat zur Extraktion der Analysenprobe,
- B = mit Säure ausgeschüttelter Anteil von A in ml, siehe Tab. 16,
- C = ml Säure, die zur Ausschüttelung von B verwendet wurde, siehe Tab. 16,
- D = auf den Startfleck aufgetragener Anteil von C in ml, siehe Tab. 16,
- E = ng pro Vergleichsfleck, in der Regel 50 ng, siehe Kap. 5.6.
- R = mittlere Ausbeute in Zusatzversuchen in %, siehe Kap. 3.4.2.

Unter Berücksichtigung der Anzahl der pro Analysenprobe eingesetzten Tiere rechnete man die gefundene Substanzmenge in Prozent der applizierten Menge um. Die im gesamten Lebergewebe gefundene Substanzmenge wurde zusätzlich auf ein Stück Leber oder 1 g Leber bezogen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALBERT, A. :
Selective Toxicity, 4. ed.,
Methuen & Co. Ltd., London, 1968
- 2) BARNICKEL, H. :
Dissertation, Erlangen 1968
- 3) BOWMAN, R. L. :
Microchem. J., Symp. Ser. -Submicrogram.
Experimentation, 1, 335 (1961)
- 4) BRODIE, B. B., S. UDENFRIEND, J. E. BAER :
J. biol. Chemistry 168, 299 (1947)
- 5) BRODIE, B. B., S. UDENFRIEND, W. DILL, Th. CHENKIN :
J. biol. Chemistry 168, 319 (1947)
- 6) BRODIE, B. B., S. UDENFRIEND, J. V. TAGGART :
J. biol. Chemistry 168, 327 (1947)
- 7) BRODIE, B. B., S. UDENFRIEND, W. DILL :
J. biol. Chemistry 168, 335 (1947)
- 8) BRODIE, B. B., S. UDENFRIEND :
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74, 845 (1950)
- 9) BRODIE, B. B. :
J. Amer. med. Assoc. 202, 600 (1967)
- 10) BRODIE, B. B., W. D. REID :
Federation Proc. 26, 1062 (1967)
- 11) BRUCE-CHWATT, L. J. :
Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg. 59, 105 (1965)
- 12) v. BUDDENBROCK, W. :
Vergleichende Physiologie, Bd. III,
Birkhäuser Verlag, Basel - Stuttgart 1956

- 13) CASTAGNOU, R., M. SYLVESTRE :
Bull. Trav. Soc. Pharmac. Bordeaux 105, 121 (1966)
ref. C.A. 67, 62821 (1967)
- 14) COATNEY, G.R., W.C. COOPER, N.B. EDDY, J. GREENBERG :
Survey of Antimalarial Agents, Public Health Monograph
No. 9, Publ. Health Serv. Publ. No. 193,
U.S. Governm. Print. Off., Washington 1953
- 15) COHEN, Y., L. PICHAT, J. LACAPERE, M.C. VIAL :
Rev. Rhumat. 29, 670 (1962)
- 16) DANN, O., P. NICKEL :
Liebigs Ann. Chem. 667, 101 (1963)
- 17) DAVY, D.G. :
Ann. trop. Med. Parasitol. 40, 52 (1946)
- 18) DOST, F.H. :
Grundlagen der Pharmakokinetik, 2. Aufl.,
G. Thieme Verlag, Stuttgart 1968
- 19) DRAKE, N.L., H.J. CREECH, D. DRAPER, J.A. GARMAN,
S. HAYWOOD, R.M. PECK, E. WALTON, J. O. NEILL
van HOOK :
J. Amer. chem. Soc. 68, 1214 (1946)
- 20) DUBOST, P., M. ALLINNE :
Bull. Sci. pharmacol. 46, 367 (1939),
ref. C.A. 34, 1700² (1940)
- 21) DUGGAN, D.E., R.L. BOWMAN, B.B. BRODIE, S. UDENFRIEND:
Arch. Biochem. Biophysics 68, 1 (1957)
- 22) EHRLHART, G., R. RUSCHIG :
Arzneimittel, Bd. 2,
Verlag Chemie GmbH., Weinheim/Bergstr., 1968
- 23) EISENBRAND, J. : -
Fluorimetrie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH., Stuttgart 1966
- 24) ELDERFIELD, R.C., L.L. SMITH :
J. Amer. chem. Soc. 75, 1022 (1953)

- 25) ELSLAGER, E.F., M.P. HUTT, L.M. WERBEL :
J. Heterocycl. Chem. 6, 99 (1969)
- 26) ELSLAGER, E.F. ;
Progress in Malaria Chemotherapy, Part 1,
Repository Antimalarial Drugs, in E. Jucker,
Fortschritte der Arzneimittelforschung, Vol. 13, 170 ff.
Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart, 1969
- 27) ENSOR, E.M. :
Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg. 60, 75 (1966)
- 28) FINDLAY, G.M. :
Recent Advances in Chemotherapy, Vol. 2, Malaria,
J. & A. Churchill Ltd., London, 1951
- 29) FINK, E., P. NICKEL, O. DANN :
Arzneimittel-Forsch. 20, 1775 (1970)
- 30) FINK, E. :
Privatmitteilung
- 31) FÖRSTER, Th. :
Fluoreszenz organischer Verbindungen,
Verlag Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1951
- 32) FOURNEL, J. :
Ann. pharmac. franc. 24, 133 (1966)
- 33) FUHRMANN, G. :
Z. Tropenmed. Parasitol. 2, 279 (1950)
- 34) FUHRMANN, G. :
Z. Tropenmed. Parasitol. 12, 152 (1961)
- 35) FUHRMANN, G., K. WERRBACH :
a) Z. Tropenmed. Parasitol. 16, 269 (1965)
b) " 16, 272 (1965)
c) " 16, 395 (1965)
d) " 16, 397 (1965)
- 36) GARNHAM, P.C.C. :
Malaria Parasites and other Haemosporidia,
Blackwell Scientific Publications,
Oxford, 1966

- 37) GAUDETTE, L.E., G.R. COATNEY :
Amer. J. trop. Med. Hyg. 10, 321 (1961)
- 38) GÄNSHIRT, H. :
Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen,
in Stahl, E., Dünnschichtchromatographie,
Ein Laboratoriumshandbuch, 2. Aufl.,
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1967
- 39) Gebrauchsanleitung zum Zeiss Chromatogramm-Spektralphotometer
- 40) GILLETTE, J.R. :
Federation Proc. 26, 1040 (1967)
- 41) Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie,
21, Erg.-Bd., 890, 8. Aufl.,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1952
- 42) GOLDBAUM, L.R., M.A. WILLIAMS :
J. Forensic Sci. 4, 144 (1959)
- 43) GOURLEY, D.R.H. :
Biological Responses to Drugs
in A. Bruger, Medicinal Chemistry, Part I,
3rd ed.,
Wiley-Interscience, New York - London - Sydney -
Toronto 1970
- 44) HALLMANN, L. :
Klinische Chemie und Mikroskopie, 10. Aufl.,
G. Thieme Verlag, Stuttgart 1966
- 45) HÖLZEL, W.-R. :
Dissertation, Erlangen 1971
- 46) HOLTZMAN, J.L. :
Anal. Biochem. 13, 66 (1965)
- 47) HUGHES, H.B., L.H. SCHMIDT :
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73, 581 (1950)
- 48) IRVIN, J.L., E.M. IRVIN :
J. biol. Chemistry 174, 589 (1948)

- 49) JÄNCHEN, D., G. PATAKI :
J. Chromatogr. 33, 391 (1968)
- 50) JATZKEWITZ, H. :
Hoppe Seyler's Z. f. physiol. Chem. 292, 94 (1953)
- 51) JORK, H. :
IV. Intern. Chromatog. Symp., Brüssel 1966,
zitiert nach 54).
- 52) JORK, H. :
Druckschrift S 50-684-d,
C. Zeiss, Oberkochen, Württ.
- 53) JORK, H. :
Cosmo Pharma 3, 33 (1967)
- 54) JORK, H. :
J. Chromatogr. 33, 297 (1968)
- 55) KLAUS, R. :
J. Chromatogr. 16, 311 (1964)
- 56) KLAUS, R. :
Pharmaz. Ztg. 112, 480 (1967)
- 57) KLAUS, R. :
J. Chromatogr. 34, 539 (1968)
- 58) KURODA, K. :
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 137, 156 (1962)
- 59) Landolt-Börnstein, Physikalisch-chemische Tabellen,
II. Erg.-Bd. bzw. III. Erg.-Bd.,
Verlag J. Springer, Berlin 1931 bzw. 1935
- 60) MACOMBER, P.B., R.L. O'BRIEN, F.E. HAHN :
Science (New York) 152, 1374 (1966)
- 61) McCHESNEY, E.W., J.P. McAULIFF, A.R. SURREY,
A.J. OLIVET :
Fedn. Proc. 13, 97 (1954)
- 62) McCHESNEY, E.W., H.S. WYZAN, J.P. McAULIFF :
J. Amer. Pharmac. Assoc. 45, 640 (1956)

- 63) McCHESNEY, E.W., W.F. BANKS, J.P. McAULIFF :
Antibiot. Chemotherapy 12, 583 (1962)
- 64) McCHESNEY, E.W., W.D. CORNWAY, W.F. BANKS,
J.E. ROGERS, J.M. SHEKOSKY, A.J. GRACE,
A.F. JENSEN, D.J. SULLIVAN :
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 151, 482 (1966)
- 65) McCHESNEY, E.W., J.M. SHEKOSKY, P.H. HERNANDEZ :
Biochem. Pharmacol. 16, 2444 (1967)
- 66) McCHESNEY, E.W., M.J. FASCO, W.F. BANKS,
T.B. KERSCH :
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 158, 323 (1967)
- 67) MELLETT, L.B. :
Comparativ Drug Metabolism,
in E. Jucker, Fortschritte der Arzneimittelforschung,
Vol. 13, 136 ff,
Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart, 1969
- 68) MESSERSCHMIDT, W., W. WEISSER :
J. Chromatogr. 38, 156 (1968)
- 69) MESSERSCHMIDT, W. :
Präp. Pharmazie 6, 92 (1970)
- 70) MONNET, R., H. BOITEAU, C. MOUSSION :
Ann. Biol. Clin. (Paris) 22, 429 (1964)
- 71) MÜTING, D. :
Nature (London) 195, 1003 (1962)
- 72) NAUCK, E.G. :
Lehrbuch der Tropenkrankheiten,
G. Thieme Verlag, Stuttgart 1962
- 73) NICKEL, P. :
Dissertation, Erlangen 1961
- 74) NICKEL, P. :
Habilitationsschrift, Erlangen 1969
- 75) NICKEL, P. :
Privatmitteilung

- 76) NICKEL, P., L. SCHRIMPL, E. FINK, O. DANN :
Liebigs Ann. Chem. 744, 119 (1971)
- 77) OLSON, O.W. :
Animal Parasites: Their Biology and Life Cycles,
2nd ed., Burgess Publishing Company,
Minneapolis, Minn., 1967
- 78) PATAKI, G. :
Chromatographia 1, 492 (1968)
- 79) PESSERL, A. :
Z. vergleich. Physiol. 27 (1939),
zitiert nach 12).
- 80) PETERS, W. :
Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., Vol. 61/3, 400 (1967),
ref. Trop. Dis. Bull. 64, 1302 (1967)
- 81) PETERS, W. :
Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria,
Academic Press, London and New York 1970
- 82) PIEKARSKI, G. :
Lehrbuch der Parasitologie,
Springer Verlag, Berlin, 1954
- 83) PINDER, R.M. :
Antimalarials in A. Burger, Medicinal Chemistry,
Part I, 3rd ed.,
Wiley-Interscience, New York - London - Sydney -
Toronto 1970
- 84) PREISINGER, L. :
Dissertation, Erlangen 1970
- 85) PRICE, C.C., W.G. JACKSON, A. PHOLAND :
J. Amer. chem. Soc. 70, 2983 (1948)
- 86) PROUTY, W.R., K. KURODA :
J. Lab. clin. Med. 52, 477 (1958)
- 87) RENNER, E. :
Mathematisch-statistische Methoden in der praktischen
Anwendung,
Verlag P. Parey, Berlin und Hamburg 1970

- 88) ROBINSON, A.E., A.J. COFFER, F.E. CAMPS :
J. Pharm. Pharmacol. 22, 700 (1970)
- 89) RÖDER, K., E. EICH, E. MUTSCHLER :
Pharmaz. Ztg. 115, 1439 (1970)
- 90) ROLLO, J.M. :
Drugs used in the Chemotherapy of Malaria,
in L.S. Goodman and A. Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4. Aufl.,
The MacMillan Company, New York 1970.
- 91) SCHERMER, S. :
Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere,
2. Aufl., J.A. Barth Verlag, Leipzig 1958
- 92) SCHNEIDER, J., A. NENNA, J. COUTURE :
Bull. World Health Organ. 29, 417 (1963)
- 93) SCHNITZER, R.J., F. HAWKING :
Experimental Chemotherapy 1, 487 ff,
Academic Press, New York - London, 1963
- 94) SCHÖNHÖFER, F., W. SCHULEMANN :
a) Dtsch. Bundes-Pat. 1.186.861 vom 7.10.1965
b) Belg. Pat. 614.245, ref. C.A. 58, 3405 f (1963)
c) Franz. Pat. M 2433, ref. C.A. 61, 13290 g (1964)
d) Engl. Pat. 970.949 (1964)
- 95) SCHÖNHÖFER, F. :
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 274, 1 (1942)
- 96) SCHRIMPL, L. :
Dissertation, Erlangen 1968
- 97) SHANNON, J.A., D.P. EARLE, Jr., B.B. BRODIE,
J.W. TAGGART, R.W. BERLINER :
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 81, 307 (1944),
zitiert nach 9).
- 98) SMITH, C.C. :
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 116, 67 (1956)

- 99) STAHL, E.:
Dünnschichtchromatographie,
Ein Laboratoriumshandbuch, 2. Aufl.,
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg- New York 1967
- 100) STAHL, E., H. JORK :
Zeiss-Information 16, 52 (1968)
- 101) STECK, E.A., F.C. NACHOD :
Z. physik. Chem. 15, 372 (1958)
- 102) STEPHAN, J., B. KAKAC :
Med. Exptl. 11, 352 (1964)
- 103) STRUFE, R.:
Clin. Chim. Acta 5, 753 (1960)
- 104) THER, L.:
Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1965
- 105) TITUS, E.O., L.C. CRAIG, C. GOLUMBIC,
H.R. MIGTHON, I.M. WEMPEN, R.C. ELDERFIELD :
J. org. Chemistry 13, 39 (1948)
- 106) UDENFRIEND, S., D.E. DUGGAN, B.M. VASTA,
B.B. BRODIE :
J. Pharmacol. exp. Therapeut. 120, 26 (1957)
- 107) UDENFRIEND, S.:
Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Vol. I,
Academic Press, New York - London 1962
- 108) WAARST, V.:
Arch. Pharm. Chemi. 71, 116 (1964)
- 109) WILLIAMS, R.T.:
Detoxication Mechanisms, 2. Aufl.,
Chapman & Hill Ltd., London 1959
- 110) WILLIAMS, R.T.:
Federation Proc. 26, 1029 (1967)

- 111) WURMBACH, H. :
Lehrbuch der Zoologie II, Spezielle Zoologie,
G. Fischer Verlag, Stuttgart 1962
- 112) ZIMMERMANN, R. :
Dissertation, Erlangen 1971
- 113) ZUBROD, C.G., T.J. KENNEDY, J.A. SHANNON :
J. clin. Invest. 27, Suppl. (No. 3, Pt. II), 114 (1948)
- 114) ZÜRCHER, H., G. PATAKI, J. BORKO, R.W. EREI :
J. Chromatogr. 43, 457 (1969)
-
-

LEBENS LAUF

30. 8. 1942 Geboren in Landeshut/Schlesien als erstes von zwei Kindern; Vater: Kurt Münch, Drogist; Mutter: Gertrud Münch, geb. Fabich, Drogistin.
- 1949 - 1953 Besuch der Volksschule in Sehnde, Kreis Burgdorf / Han.
- 1953 - 1962 Besuch des Gymnasiums in Lehrte.
19. 2. 1962 Abitur am Gymnasium in Lehrte.
- 1962 - 1964 Apothekerpraktikan in der Industrie-Apotheke, J. Neuling, in Misburg bei Hannover.
24. 3. 1964 Pharmazeutische Vorprüfung in Hannover.
- 1964 - 1967 Studium der Pharmazie in Erlangen.
10. 3. 1967 Pharmazeutische Staatsprüfung in Erlangen.
1. 4. 67 - 30. 9. 67 Kandidat in der Schloß-Apotheke, K. Kleinheinz, Eislingen/Fils.
- Ab 1. 11. 1967 Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft bei Professor Dr. O. D a n n am Institut für Angewandte Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg.
- Ab 1. 11. 1968 Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990